

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química



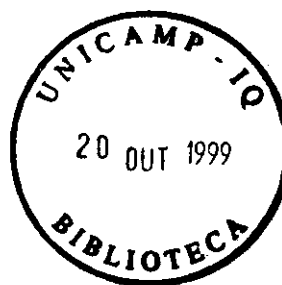
**Uso de Etanol como Modificador Orgânico
de Fase Móvel para Cromatografia Líquida de
Alta Eficiência**

Ricardo Luiz Vasconcelos Ribeiro

Dissertação de Mestrado

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carol H. Collins

Fevereiro/1999



**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

UNIDADE	IQA	
N.º CHAMADA:	UNICAMP	
	R354u	
V.	Ex.	
TOMBO BC/38903		
PROC. 229/99		
C	☐	D ☒
PREÇO	R\$ 11,00	
DATA	05/10/99	
N.º CPD		

CM-00126234-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

R354u Ribeiro, Ricardo Luiz Vasconcelos
 Uso de etanol como modificador orgânico de fase móvel para cromatografia
 líquida de alta eficiência / Ricardo Luiz Vasconcelos Ribeiro. - - Campinas,
 SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Carol H. Collins

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
 Química.

1. CLAE. 2. Planejamento fatorial. 3. Fase reversa. I. Collins, Carol H.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.



Deus

No sucesso de cada etapa vencida e na esperança de vencermos outras tantas etapas, nos vem a certeza da presença da misericórdia divina em nossas almas.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aqueles que superaram a distância e a saudade para me darem o incentivo necessário: meus pais José Luiz e Normilde e meu eterno amor Kátia, minha eterna gratidão. O amor de vocês foi a luz que me guiou neste caminho.

“Todas as coisas têm seu tempo, e todas elas passam debaixo do céu segundo o termo que a cada uma foi prescrito. Há tempo de nascer e tempo de morrer. Há tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou. Há tempo de matar e tempo de sarar. Há tempo de destruir e tempo de edificar. Há tempo de chorar e tempo de rir. Há tempo de se afligir e tempo de saltar de gosto. Há tempo de espalhar pedras e tempo de as juntar. Há tempo de dar abraços e tempo de se pôr longe deles. Há tempo de adquirir e tempo de perder. Há tempo de aguardar e tempo de lançar fora. Há tempo de rasgar e tempo de coser. Há tempo de amor e tempo de ódio. Há tempo de guerra e tempo de paz.

O que foi feito, isso mesmo permanece. As coisas que hão de ser, já foram: e Deus renova aquilo que passou”. (Eclesiaste, cap. 3, vv. 1 a 8, 15).

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.*

Ricardo Reis, 14/2/1933.

AGRADECIMENTOS

- À Prof^a. Dr^a. Carol H. Collins pela orientação, paciência e por ter transmitido não apenas seus ensinamentos, mas um grande incentivo.
- Aos professores Dr. Kenneth E. Collins e Dr^a. Isabel C. S. F. Jardim pelas sugestões e esclarecimento de dúvidas.
- Ao professor Dr. Roy E. Bruns pelo auxílio e esclarecimento de dúvidas no planejamento fatorial empregado neste trabalho.
- Ao professor Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda pelas sugestões dadas para a conclusão deste trabalho.
- Ao meu irmão Leonardo, minha cunhada Geralda e meus sobrinhos Leozinho e Gabriel, pelo carinho e incentivo.
- Aos amigos e colegas do laboratório de cromatografia: Lúcio Flávio (Piumhi), Patrícia (Maionese), Andreia (Danete), Carla 'Maria', Rosely 'Maria', Gláucia Maria, Joseane, Soninha e Dania pelo companheirismo que ajudou a superar a saudade de casa.
- Aos amigos e colegas: Joely, Zanoni (Danone), Zuin, Pezzin (Gerente), Tânia, Edenir, Dannel, Enereida e Larissa.
- Aos funcionários da Unicamp Valter, Priscila, Bel e André pela amizade e pelos serviços prestados.
- Ao ex-funcionário da Unicamp e sempre amigo Joãozinho.
- À CAPES pela bolsa de estudo concedida.
- Ao Instituto de Química da Unicamp pela oportunidade concedida.
- À todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Seleção do solvente em CLAE.....	1
1.1.1. Compatibilidade com o detetor.....	2
1.1.2. Viscosidade e Ponto de Ebulição.....	4
1.1.3. Miscibilidade dos solventes.....	6
1.1.4. Compatibilidade com a fase estacionária.....	7
1.1.5. Compatibilidade com os componentes da amostra.....	8
1.1.6. Pureza dos solventes.....	8
1.1.7. Toxicidade.....	9
1.2. Parâmetros Cromatográficos.....	10
1.3. Mecanismo de retenção do soluto no processo cromatográfico.....	13
1.3.1. Forças intermoleculares entre o soluto e a fase móvel.....	14
1.3.2. Composição e propriedades da fase móvel.....	15
1.3.3. Tipos e propriedades da fase estacionária.....	20
1.3.4. Efeito da temperatura sobre a separação.....	23
1.4. Ajuste da polaridade da fase móvel.....	24
1.5. Métodos quimiométricos de planejamento e otimização - Planejamento Fatorial.....	27
2. OBJETIVOS.....	32
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	33
3.1. Espectros UV-VIS.....	33
3.2. Viscosidade das misturas etanol:água.....	33
3.3. Fase estacionária.....	33

3.4.Preparação da mistura padrão.....	34
3.5.Condições operacionais do sistema cromatográfico.....	34
3.6.Otimização das condições de separação.....	35
3.7.Otimização da vazão da fase móvel através da curva de van Deemter.....	36
3.8.Efeito da temperatura sobre a separação.....	37
3.9.Teste de estabilidade das fases estacionárias frente ao uso de etanol:água como fase móvel.....	38
3.10.Separação de uma mistura de componentes básicos.....	39
4.RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
4.1.Parâmetros físico-químicos.....	40
4.2.Resultados do planejamento fatorial obtidos com a coluna C18.....	42
4.3.Resultados do planejamento fatorial obtidos com a coluna C8.....	50
4.4.Otimização da vazão da fase móvel pela curva de van Deemter.....	58
4.5.Efeito da temperatura sobre a separação.....	64
4.6.Resultados do teste de estabilidade das fases estacionárias frente ao uso de etanol:água como fase móvel.....	71
4.7.Separação da mistura básica.....	78
5.CONCLUSÕES.....	82
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. "UV-cutoff" de vários solventes.....	3
Tabela 2. Ponto de ebulição de alguns solventes.....	5
Tabela 3. Solventes orgânicos e seus efeitos tóxicos.....	9
Tabela 4. Grupos de solventes com seletividades similares.....	18
Tabela 5. Parâmetro de polaridade P' de alguns solventes.....	19
Tabela 6. Grupos funcionais de sílicas quimicamente modificadas.....	20
Tabela 7. Força de solventes (S).....	25

Tabela 8. Combinação dos ensaios de planejamento fatorial 2^3	29
Tabela 9. Condições de recheio das colunas cromatográficas C8 e C18.....	34
Tabela 10. Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3	35
Tabela 11. Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^2	36
Tabela 12. Composição das fases móveis.....	37
Tabela 13. Composição das fases móveis.....	39
Tabela 14. Resultados obtidos com o planejamento fatorial 2^3 (coluna C18-1)..	43
Tabela 15. Estimativas dos efeitos (da tabela 14).....	43
Tabela 16. Resultados do planejamento fatorial 2^2 (coluna C18-1).....	49
Tabela 17. Resultados obtidos com o planejamento fatorial 2^3 (coluna C8-3)....	51
Tabela 18. Estimativas dos efeitos (da tabela 17).....	51
Tabela 19. Resultados do planejamento fatorial 2^2 (coluna C8-3).....	56
Tabela 20. Vazão das fases móveis otimizadas pela curva de van Deemter (coluna C18-1).....	58
Tabela 21. Vazão das fases móveis otimizadas pela curva de van Deemter (coluna C8-4).....	58
Tabela 22. Efeito da temperatura sobre a separação cromatográfica (coluna C18- 1); FM EtOH:H ₂ O (60:40 v/v); F=0,2mL min ⁻¹	64
Tabela 23. Efeito da temperatura sobre a separação cromatográfica (coluna C8- 4); FM EtOH:H ₂ O (55:45 v/v); F=0,2mL min ⁻¹	65
Tabela 24. Efeito da temperatura sobre a separação cromatográfica (coluna C18- 1); FM MeOH:H ₂ O (72:28 v/v); F=0,2mL min ⁻¹	65
Tabela 25. Efeito da temperatura sobre a separação cromatográfica (coluna C8- 4); FM MeOH:H ₂ O (66:34 v/v); F=0,2mL min ⁻¹	66
Tabela 26. Efeito da temperatura sobre a separação cromatográfica (coluna C18- 1); FM ACN:H ₂ O (70:30 v/v); F=0,2mL min ⁻¹	66
Tabela 27. Efeito da temperatura sobre a separação cromatográfica (coluna C8- 4); FM ACN:H ₂ O (64:36 v/v); F=0,2mL min ⁻¹	67
Tabela 28. Parâmetros cromatográficos obtidos com a separação da mistura básica - coluna C18-1.....	78

Tabela 29. Parâmetros cromatográficos obtidos com a separação da mistura básica - coluna C8-3.....	80
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectros dos solventes acetonitrila, metanol e tetraidrofurano.....	3
Figura 2. Curvas de viscosidade para acetonitrila:água, metanol:água e tetraidrofurano:água a 20 °C.....	5
Figura 3. Miscibilidade de diversos solventes utilizados em CL.....	7
Figura 4. Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos.....	10
Figura 5. Assimetria de picos (a) cauda frontal e (b) cauda.....	12
Figura 6. Separação de nitrocompostos aromáticos. (a) metanol:água 30:70 (v/v); (b) metanol:água 50:50 (v/v); (c) metanol:água 70:30 (v/v).....	16
Figura 7. Triângulo de seletividade para solventes.....	18
Figura 8. Separação cromatográfica com diferentes colunas. A = cortisona, B = hexametasona, C = corticosterona, D = o-nitrofenol e E = fluorbenzeno. (a) coluna C18 (octadecil), acetonitrila:água. (b) 36:64 (v/v); coluna C6 (fenil), acetonitrila:água 29:71 (v/v); (c) coluna CN (nitrila), acetonitrila:água 20:80 (v/v).....	21
Figura 9. Separação cromatográfica usando fases estacionárias com (a) 5 e (b) 3,5 µm de diâmetro. (1) fenilalanina, (2) ácido 5-benzil-3,6-dioxe-2-piperarazinoacético, (3) ácido fenilalanina aspártico, (4) aspartame.....	22
Figura 10. Efeito do modificador orgânico na separação dos picos. (a) MeOH:H ₂ O 50:50 (v/v). (b) THF:H ₂ O 32:68 (v/v). 1 = álcool benzílico, 2 = fenol; 3 = fenil-propanol; 4 = 2,4-dimetil-fenol; 5 = benzeno; 6 = dietilftalato.....	26
Figura 11. Fatores e níveis de um planejamento fatorial 2 ²	28
Figura 12. Fatores e níveis de um planejamento fatorial 2 ³	29

Figura 13. Gráfico normal dos efeitos.....	31
Figura 14. Espectro de absorção no UV-VIS de duas amostras diferentes de etanol (Merck).....	40
Figura 15. Espectro de absorção no UV-VIS de alguns solventes orgânicos.....	41
Figura 16. Curva de viscosidade de misturas etanol:água a diferentes temperaturas.....	42
Figura 17. Distribuição normal dos efeitos para eficiência (N/m) - C18.....	44
Figura 18. Distribuição normal dos efeitos para resolução (R_s) - C18.....	44
Figura 19. Distribuição normal dos efeitos para o fator de assimetria (A_s) - C18.....	45
Figura 20. Distribuição normal dos efeitos para o fator de retenção (k) - C18....	45
Figura 21. Distribuição normal dos efeitos para o tempo de retenção (t_R) - C18.....	46
Figura 22. Resultados do fatorial 2^3 - coluna C18-1.....	47
Figura 23. Cromatogramas obtidos com a coluna C18-1 pelo planejamento fatorial 2^3 . (a) temperatura 30 °C, EtOH:H ₂ O 60:40 (v/v), vazão 0,1 mL min ⁻¹ . (b) temperatura 50 °C, EtOH:H ₂ O 60:40 (v/v), vazão 0,2 mL min ⁻¹	49
Figura 24. Cromatogramas obtidos com a coluna C18-1 pelo planejamento fatorial 2^2 . (a) temperatura 30 °C, EtOH:H ₂ O 65:35 (v/v), vazão 0,15 mL min ⁻¹ . (b) temperatura 40 °C, EtOH:H ₂ O 65:35 (v/v), vazão 0,15 mL min ⁻¹	50
Figura 25. Distribuição normal dos efeitos para eficiência (N/m) - C8.....	52
Figura 26. Distribuição normal dos efeitos para resolução (R_s) - C8.....	52
Figura 27. Distribuição normal dos efeitos para o fator de assimetria (A_s) - C8.....	53
Figura 28. Distribuição normal dos efeitos para o fator de retenção (k) - C8.....	53
Figura 29. Distribuição normal dos efeitos para o tempo de retenção (t_R) - C8.....	54
Figura 30. Resultados do fatorial 2^3 - coluna C8-3.....	54

Figura 31. Cromatogramas obtidos com a coluna C8-3 pelo planejamento fatorial 2 ³ . (a) temperatura 50 °C, EtOH:H ₂ O 55:45 (v/v), vazão 0,20 mL min ⁻¹ . (b) temperatura 50 °C, EtOH:H ₂ O 60:40 (v/v), vazão 0,20 mL min ⁻¹	56
Figura 32. Curvas de van Deemter - coluna C18.....	59
Figura 33. Curvas de van Deemter - coluna C18.....	60
Figura 34. Parâmetros Cromatográficos obtidos com cada modificador orgânico - coluna C18-1.....	61
Figura 35. Parâmetros Cromatográficos obtidos com cada modificador orgânico - coluna C8-4.....	62
Figura 36. Parâmetros cromatográficos em função da temperatura - coluna C18-1.....	67
Figura 37. Parâmetros cromatográficos em função da temperatura - coluna C8-4.....	69
Figura 38. Resultados do teste de estabilidade usando EtOH:H ₂ O 60:40 (v/v) como fase móvel - coluna C18-2.....	71
Figura 39. Cromatograma da separação obtida com a coluna C18-2 após 250 VM EtOH:H ₂ O 60:40 (v/v); F=0,2 mL min ⁻¹ - 40 °C.....	72
Figura 40. Cromatograma da separação obtida com a coluna C18-2 após 10.000 VM EtOH:H ₂ O 60:40 (v/v); F=0,2 mL min ⁻¹ - 40 °C.....	73
Figura 41. Cromatograma da separação obtida com a coluna C18-2 após 5.000 VM EtOH:H ₂ O 60:40 (v/v); F=0,2 mL min ⁻¹ - 60 °C.....	73
Figura 42. Cromatograma da separação obtida com a coluna C18-2 após 15.000 VM EtOH:H ₂ O 60:40 (v/v); F=0,2 mL min ⁻¹ - 40 °C.....	74
Figura 43. Resultados do teste de estabilidade usando EtOH:H ₂ O como fase móvel - coluna C8-4.....	75
Figura 44. Cromatograma da separação obtida com a coluna C8-4 após 250 VM EtOH:H ₂ O 55:45 (v/v); F=0,2 mL min ⁻¹ - 40 °C.....	76
Figura 45. Cromatograma da separação obtida com a coluna C8-4 após 10.000 VM EtOH:H ₂ O 55:45 (v/v); F=0,2 mL min ⁻¹ - 40 °C.....	76

Figura 46. Cromatograma da separação obtida com a coluna C8-4 após 5.000 VM EtOH:H ₂ O 55:45 (v/v); F=0,2 mL min ⁻¹ - 60 °C.....	77
Figura 47. Cromatogramas obtidos com a coluna C18-1 para a separação da mistura básica utilizando EtOH a 25 °C (a), EtOH a 40 °C (b), MeOH (c) e ACN (d) como modificadores orgânicos e fase estacionária C18. (1) anilina; (2) N',N'-dimetilanilina.....	79
Figura 48. Cromatogramas obtidos com a coluna C8-3 para a separação da mistura básica utilizando EtOH a 25 °C (a), EtOH a 40 °C (b), MeOH (c) e ACN (d) como modificadores orgânicos e fase estacionária C8. (1) anilina; (2) N',N'-dimetilanilina.....	80

RESUMO

TÍTULO: USO DE ETANOL COMO MODIFICADOR ORGÂNICO DA FASE MÓVEL PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

AUTOR: Ricardo Luiz Vasconcelos Ribeiro

ORIENTADORA: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins

Os modificadores orgânicos mais utilizados atualmente em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase reversa são metanol e acetonitrila. Devido à suas excelentes propriedades cromatográficas, baixas viscosidades - quando misturados com água - e as suas disponibilidades comerciais em alta pureza, esses solventes orgânicos tornaram-se preferidos em análises cromatográficas. Outros solventes, tais como etanol, isopropanol e acetona, foram testados, mas vários problemas foram observados, tais como a dificuldade de purificá-los, resultando em alta absorção na região UV-VIS, ou a necessidade de pressões mais elevadas para empurrar a fase móvel através da coluna, resultado da maior viscosidade. Desde então, os métodos de purificação foram aperfeiçoados e os equipamentos hoje disponíveis suportam pressões bem mais elevadas (4×10^7 Pa, 6000 psi). Sendo assim, algumas desses modificadores merecem uma reinvestigação. Entre os solventes orgânicos polares disponíveis hoje com alta pureza e baixa absorbância no UV-VIS, o Etanol merece uma reconsideração ponderosa, já que é um solvente muito menos tóxico quando comparado aos mais usados - metanol e acetonitrila. Os estudos deste trabalho visaram a otimização de etanol:água como fase móvel para CLAE, em função da composição e vazão da fase móvel e da temperatura de separação, utilizando colunas cromatográficas do tipo C8 e C18. Os resultados mostraram que o etanol possui um grande potencial em relação ao uso rotineiro em separações cromatográficas, especialmente em temperaturas superiores à ambiente, onde a viscosidade da fase móvel é menor.

ABSTRACT

TITLE: Use of ethanol as an organic mobile phase modifier for High Performance Liquid Chromatography.

AUTHOR: Ricardo Luiz Vasconcelos Ribeiro

SUPERVISOR: Dr^a. Carol Hollingworth Collins

The most used organic modifiers for High Performance Liquid Chromatography (HPLC) are methanol and acetonitrile. Due to good chromatographic properties, low viscosity (when mixed with water), high purity and ready availability, these solvents are preferred in chromatographic analysis. Other solvents, such ethanol, isopropanol and acetone, have been used but problems, due to difficulties in purification (resulting in high absorbance in the ultraviolet-visible detection range) and the need for higher pressures to produce reasonable flow rates (due to high viscosity when mixed with water), were observed. Today, newer equipment supports higher pressures (4×10^7 Pa, 6000 psi) and high purity solvents are readily available. Therefore, some less common mobile phases deserve reinvestigation. Among organic solvents available with high purity and low absorbance in UV-VIS, ethanol is an interesting solvent, especially considering that it is much less toxic than methanol and acetonitrile. In this work, mixtures of ethanol:water have been tested for HPLC, using commercial C8 and C18 chromatographic phases. The results show that ethanol is a promising mobile phase modifier for routine laboratory use, especially at higher temperatures, where the mobile phase viscosity is lower.

1 - INTRODUÇÃO:

Mais de 90% das separações com colunas de fase reversa em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizam fases móveis feitas com misturas de metanol:água ou acetonitrila:água. Outras misturas do tipo orgânico:água, tais como acetona:água, etanol:água e isopropanol:água foram testadas há mais de vinte anos, mas foram consideradas menos satisfatórias. Vários problemas foram observados com estas fases, tais como a dificuldade de purificá-las, resultando em alta absorção na região UV-VIS, ou a necessidade de pressões mais elevadas para empurrar a fase móvel através da coluna, resultado da maior viscosidade. Desde então, os métodos de purificação foram aperfeiçoados e os equipamentos hoje disponíveis suportam pressões bem mais elevadas (4×10^7 Pa, 6000 psi). Sendo assim, algumas dessas fases merecem uma reinvestigação.

Entre os solventes orgânicos polares disponíveis hoje com alta pureza e baixa absorvância no UV-VIS, o etanol merece uma reconsideração ponderosa, já que é um solvente muito menos tóxico quando comparado aos mais usados - metanol e acetonitrila.

1.1 - Seleção do solvente em CLAE:

Uma das mais importantes etapas na cromatografia líquida é a seleção da fase móvel. Para obter os melhores resultados a escolha deve considerar as propriedades químicas e físicas, além da pureza dos solventes [1]. Vários fatores devem ser observados para a escolha do solvente a ser usado para o desenvolvimento cromatográfico. Os critérios de escolha começam pelas características físico-químicos adequadas ao tipo de análise a ser realizada. As propriedades mais importantes citadas, entre outras, pelos autores são [1-5]:

- compatibilidade com o detetor;
- viscosidade e ponto de ebulição;
- miscibilidade dos componentes da fase móvel;
- compatibilidade com a fase estacionária;
- dissolver a amostra e não decompor seus componentes;
- pureza do solvente e
- toxicidade.

1.1.1 - Compatibilidade com o detetor:

Atualmente, um dos detetores mais utilizados em CLAE é o detetor UV-VIS, incluindo o de comprimento de onda fixo, o de comprimento de onda variável ou o detetor por arranjo de diodos. Sendo assim, uma avaliação importante da absorvância do solvente na região UV-VIS deve ser avaliada. Essa avaliação é descrita na literatura como "UV-cutoff". Preferindo-se não fazer uma tradução deste termo, "UV-cutoff" é definido usualmente como o comprimento de onda no qual a absorvância do solvente em uma célula de 1 cm é igual a uma unidade de absorvância (1 UA), usando água como referência [1].

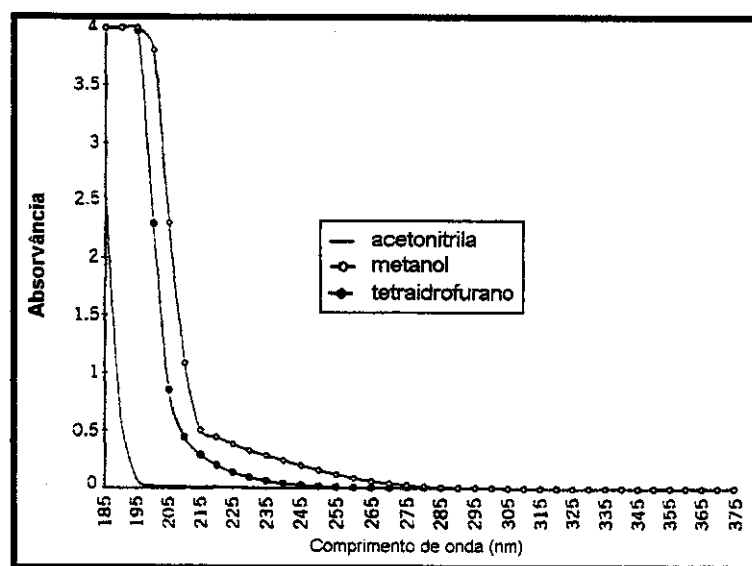
Em termos práticos, a escolha do solvente para o desenvolvimento cromatográfico está em função dos componentes da amostra a ser separada, já que o solvente não deve absorver na mesma região de trabalho. A tabela 1 apresenta o "UV-cutoff" para vários solventes.

Tabela 1 - “UV-cutoff” de vários solventes [1].

Solvente ou classe de solvente*	“Uv-cutoff” (nm)
acetonitrila (ACN)	< 190
alcanos	190-205
metanol (MeOH)	205
etanol (EtOH)	205
tetraidrofurano (THF)	212

* grau HPLC

Quanto menor o valor de “UV-cutoff” para um solvente, maior é a região espectral na qual pode-se trabalhar durante o desenvolvimento cromatográfico. Abaixo, ou até nessa região, o solvente não deve ser utilizado. SEAYER e SADEK [2], em seu artigo, relatam que em casos especiais, o solvente pode ser utilizado como modificador até um nível de 10%. A figura 1 mostra a absorvância de vários solventes orgânicos usados em CLAE de fase reversa.

**Figura 1 - Espectros dos solventes acetonitrila, metanol e tetraidrofurano [1].**

1.1.2 - Viscosidade e Ponto de Ebulição:

A viscosidade da fase móvel é uma das propriedades físico-químicas mais importantes que deve ser observada, já que pode influenciar consideravelmente na separação cromatográfica.

O equilíbrio na troca de massa do soluto entre *fase móvel/fase estacionária* pode ser mais lento quando fases móveis mais viscosas são utilizadas. O resultado obtido pode ser picos mais largos e mais assimétricos. Além disso, uma maior viscosidade resulta numa pressão maior na entrada da coluna cromatográfica (*back pressure*). Com isso, a vida útil da fase estacionária pode ser comprometida. Em casos onde há necessidade de eluição por gradiente, a alta viscosidade pode se tornar um problema, já que a pressão no sistema pode aumentar ao longo da mudança da composição da fase móvel [3].

Na literatura recomenda-se que a viscosidade para a fase móvel seja $\leq 0,5$ cP [4]. A figura 2 demonstra que, a 20 °C, grande parte das composições das fases móveis utilizadas em cromatografia de fase reversa não atendem a este requisito. Com exceção das misturas de acetonitrila:água, contendo mais de 50% do componente orgânico, os demais solventes utilizados formam misturas com água de viscosidade superior à recomendada. A alta viscosidade resultante da mistura binária etanol:água é uma variável importante que fez com que o etanol fosse deixado de ser usado.

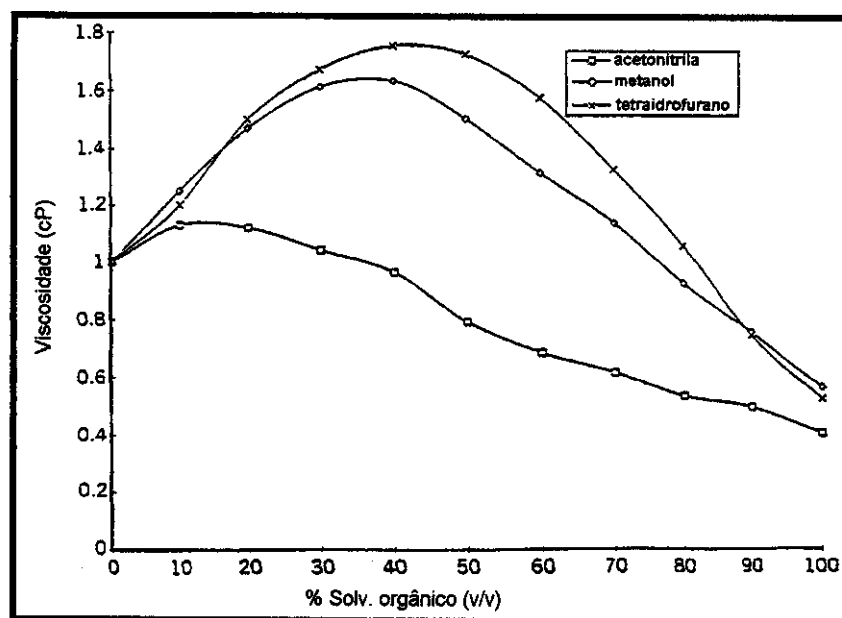


Figura 2 - Curvas de viscosidade para acetonitrila:água, metanol:água e tetraidrofurano:água a 20 °C [1].

Geralmente, o ponto de ebulição e a viscosidade de um solvente caminham lado a lado. Um solvente com baixo ponto de ebulição, geralmente apresenta também baixa viscosidade. Recomenda-se que a temperatura de separação esteja de 20 °C a 50 °C abaixo da temperatura de ebulição do solvente utilizado para evitar que se formem bolhas no sistema cromatográfico [4]. O ponto de ebulição de alguns solventes utilizados em CLAE é dado na tabela 2.

Tabela 2 - Ponto de ebulição de alguns solventes [1].

Solvente	Ponto de Ebulição (°C)
metanol (MeOH)	64,7
etanol (EtOH)	78,0
acetonitrila (ACN)	91,6
tetraidrofurano (THF)	66,0
água	100

1.1.3 - Miscibilidade dos solventes:

Um outro fator muito importante é a miscibilidade dos solventes escolhidos para a composição da fase móvel. Dois componentes que são misturados em qualquer proporção, sem que haja a formação de duas fases separadas, são considerados completamente miscíveis [1]. No sistema cromatográfico, a imiscibilidade dos componentes da fase móvel provoca aumento na pressão (*back pressure*) na entrada da coluna [3].

Solventes parcialmente miscíveis não devem ser descartados na sua utilização, mas em casos onde há a necessidade do uso de eluição por gradiente, a miscibilidade dos componentes da fase móvel deve ser testada em todas as proporções em que serão utilizadas para a separação. Outro caso importante é a adição de um tampão à fase móvel. Com o decorrer do tempo, este tampão tende a precipitar na própria fase móvel, dificultando a separação. Assim, fases móveis onde há necessidade da adição de um tampão, devem ser preparadas e já utilizadas, não se esquecendo que nunca deve-se deixar colunas estocadas com estas fases tamponadas [1, 3].

A figura 3 apresenta diversos solventes utilizados em Cromatografia Líquida. Misturas de etanol:água não apresentam problemas com relação à miscibilidade, podendo ser usadas em qualquer proporção.

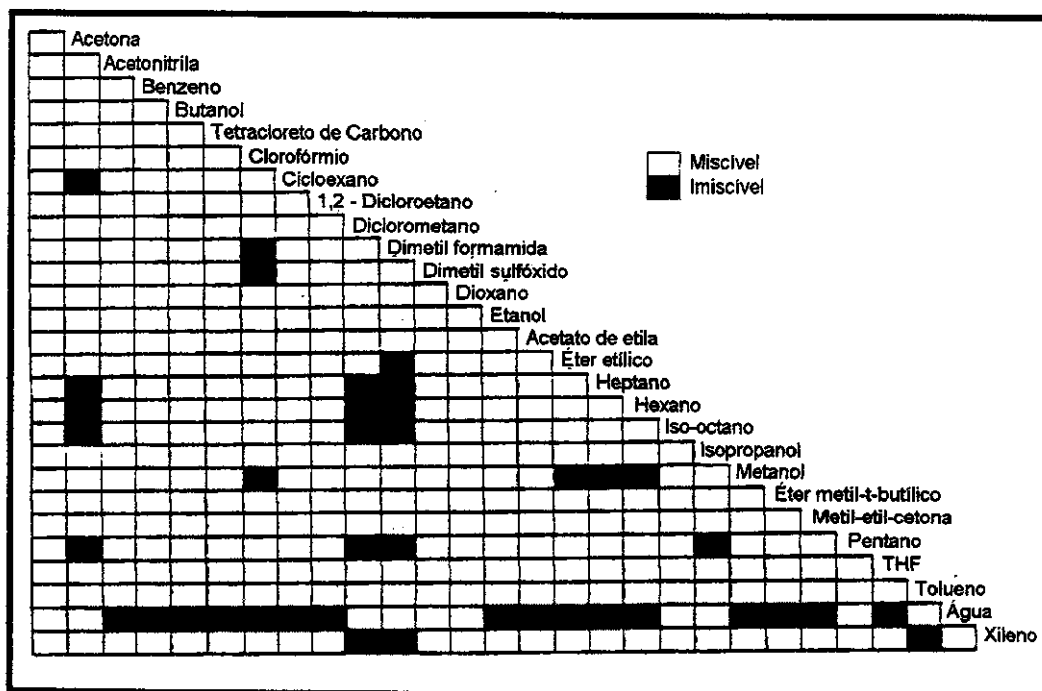


Figura 3 - Miscibilidade de diversos solventes utilizados em CL [1].

1.1.4 - Compatibilidade com a fase estacionária:

Outro aspecto bastante importante e que deve ser avaliado antes de qualquer corrida cromatográfica é a compatibilidade da fase móvel com a fase estacionária.

Em cromatografia líquido-líquido a fase móvel pode dissolver a fase estacionária. Como forma de evitar este tipo de problema, satura-se a fase móvel com a própria fase estacionária. Colunas com fase estacionária quimicamente ligada ou fase sólida necessitam apenas de uma filtração da fase móvel [5].

1.1.5 - Compatibilidade com os componentes da amostra:

A amostra a ser separada deve, de preferência, ser dissolvida na própria fase móvel que será utilizada no processo de eluição, ou em um de seus componentes, para que não ocorra precipitação no injetor ou na coluna cromatográfica e posterior queda na resolução. É importante também que a fase móvel não decomponha nenhum dos componentes da amostra [5].

1.1.6 - Pureza dos solventes:

A presença de impurezas nos solventes podem interferir em dois aspectos importantes numa separação cromatográfica. Um deles é que as impurezas presentes podem afetar o valor do "UV-cutoff" para um determinado solvente. Com isso, a região de absorção do solvente pode ficar próximo ao comprimento de onda utilizado na detecção. Outro aspecto é que essas impurezas geralmente variam de lote para lote de fabricação. Estas variações podem ser significativas para afetar a reprodutibilidade nas separações [3].

O metanol pode conter traços de etanol, acetona, formaldeído e acetaldeído e a acetonitrila pode conter álcoois, ácido acrílico e ácido acético, derivados do próprio processo de fabricação deste solvente, que não chegam a afetar a reprodutibilidade quando em baixas concentrações. Tetraidrofurano é um caso mais complicado já que pode formar peróxidos. Estes peróxidos podem reagir tanto com a fase estacionária quanto com os componentes da amostra. Como forma de evitar isso, usa-se um preservante, o BHT (2,6-di-t-butil-4-metilfenol). No entanto, o BHT tem uma alta absorvância em 270 nm. THF sem BHT (THF-UV) deve ser bem estocado e, após aberto o frasco, deve-se borbulhar N_2 como forma de deslocar o oxigênio molecular dissolvido [1].

1.1.7 - Toxicidade:

Deve-se considerar ainda, na escolha da fase móvel, o aspecto de toxicidade e a inflamabilidade do solvente orgânico. Infelizmente, aqueles solventes preferidos devido a baixa viscosidade e ponto de ebulição, são, geralmente, inflamáveis [4].

Dentre os possíveis solventes para uso em CLAE, o etanol é o que possui menor efeito tóxico (tabela 3) .

Tabela 3 - Solventes orgânicos e seus efeitos tóxicos [6].

Solvente	Efeito tóxico
acetonitrila	A inalação do vapor pode causar fadiga, náusea, diarreia e dor abdominal; em casos severos podem ocorrer delírio, convulsões, paralisia e coma.
etanol	Os efeitos tóxicos são mais pronunciados cronicamente (principalmente cirrose hepática).
metanol	A inalação do vapor em altas concentrações podem causar vertigens, distúrbios digestivos, paralisia de certos músculos. Menores concentrações podem causar náusea, vômito, dor de cabeça e irritação das membranas das mucosas. Os efeitos crônicos, mesmo a exposições em baixa concentração, podem causar muitos dos efeitos acima.
tetraidrofurano	O vapor é irritante para os olhos e sistema respiratório; altas concentrações têm efeito alucinógeno.

1.2 - Parâmetros Cromatográficos:

Uma separação cromatográfica é otimizada variando-se as propriedades das fases móvel e estacionária. As características de retenção de cada componente numa mistura dependem de fatores cinéticos - processos de transferência de massa do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária [7].

Os parâmetros cromatográficos são utilizados para comprovar a eficiência de uma separação. Vários parâmetros podem ser obtidos a partir de um cromatograma (figura 4) e são, geralmente, calculados para os picos mais retidos.

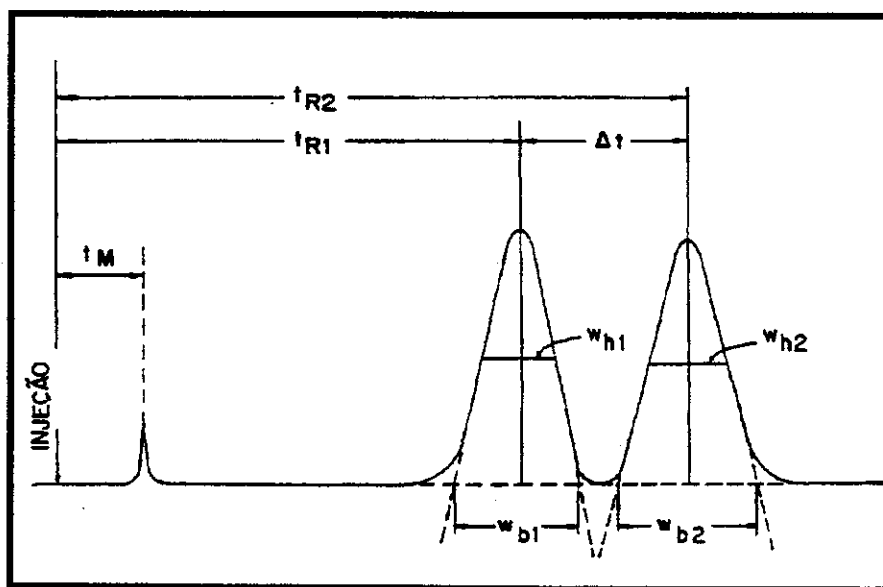


Figura 4 - Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos [5].

Para avaliar a força cromatográfica da fase móvel, ou seja, sua capacidade de separação dos componentes de uma mistura, os parâmetros cromatográficos que podem ser analisados são:

- *Resolução*: que se refere à separação entre dois picos adjacentes. A equação para se calcular a resolução dos picos cromatográficos é dada por:

$$R_s = 1,177 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{h2} + w_{h1})} \quad (1)$$

onde t_{R2} e t_{R1} são os tempos de retenção dos picos adjacentes e w_{h2} e w_{h1} são as larguras destes picos a meia altura.

A resolução entre dois picos depende das características de retenção de cada componente, a capacidade da fase estacionária reter seletivamente cada componente e, sobre tudo, da eficiência da coluna (N).

Em análises quantitativas, a resolução mínima requerida é de 1,5 para todos os picos de interesse [4].

- *Fator de assimetria*: normalmente calculada a 10% da altura do pico (figura 5).

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (2)$$

A dispersão dos componentes da amostra no sistema cromatográfico é representada por uma curva Gaussiana. Entretanto, algumas moléculas do soluto são mais fortemente retidos na fase estacionária, formando uma cauda no pico (figura 5b). Caudas frontais (figura 5a) ocorrem quando a retenção do soluto na fase estacionária é menor do que se esperava, ou seja, há uma preferência das moléculas do soluto pela fase móvel [7].

Boas colunas produzem picos com A_s de 0,9 a 1,2, mas valores em torno de 1,5 são aceitáveis desde que os picos não sejam tão largos. Picos com pobre simetria podem resultar em: (a) análises quantitativas imprecisas; (b) menor resolução e bandas menores não detectadas na cauda de outro pico e (c) problemas com reprodutibilidade na retenção [7].

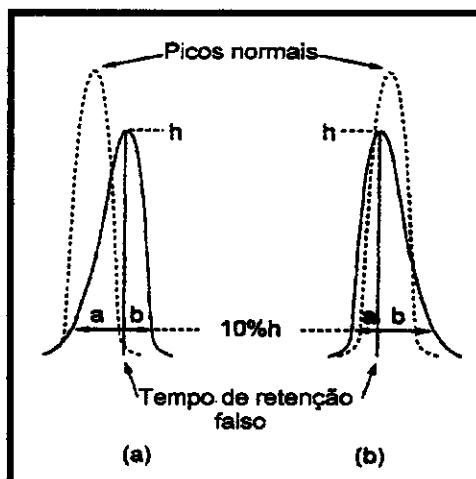


Figura 5 - Assimetria de picos (a) cauda frontal e (b) cauda [7].

- **Fator de retenção:** descreve a habilidade da fase estacionária em reter os componente de uma mistura.

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad (3)$$

Este parâmetro é importante para avaliar o tempo de retenção de um pico no sistema cromatográfico em relação ao tempo de retenção de um composto não retido no processo cromatográfico (t_M). Valores pequenos de k indicam que o soluto é pouco retido na fase estacionária.

Para amostras com dois componentes, o fator de retenção recomendado fica na faixa de 2 a 5. Para amostras com vários componentes, recomenda-se $0.5 \leq k \leq 20$ [4].

- **Eficiência da coluna:** a eficiência de uma coluna é medida em função do número de pratos teóricos, ou seja, as etapas de equilíbrio do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária [4, 5]. Geralmente é calculada a partir da largura do pico a meia altura (figura 4).

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (4)$$

Claramente, a eficiência de uma coluna é diretamente proporcional ao seu comprimento (L). Assim, o número de pratos por metro (N/m) pode ser calculado pela equação:

$$N / m = \frac{N}{L} \quad (5)$$

• *Fator de separação (ou seletividade)*: o fator de separação entre dois componentes A e B, depende da retenção de cada componente na fase estacionária. Para dois picos adjacentes, o fator de separação depende do tipo de fase estacionária utilizada, a fase móvel e a temperatura da coluna. Para que haja a separação, o valor do fator de separação deve ser maior do que 1 [7].

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} \quad (6)$$

1.3 - Mecanismo de retenção do soluto no processo cromatográfico:

O mecanismo de retenção de um soluto pode ser compreendido através da clássica definição de uma separação cromatográfica. Uma separação cromatográfica é seguida pela distribuição de um soluto entre duas fases imiscíveis, uma fase móvel (FM) e outra estacionária (FE). Aqueles solutos que são distribuídos preferencialmente na fase móvel passarão através ou pelo sistema mais rapidamente do que aquelas substâncias que são distribuídas preferencialmente na fase estacionária [8]. A distribuição relativa de um soluto entre as duas fases imiscíveis pode ser descrita segundo a equação:

$$K_A = \frac{C_{FE}}{C_{FM}} \quad (7)$$

onde K_A é o coeficiente de distribuição do soluto A entre a fase estacionária e a fase móvel, C_{FE} é a concentração do soluto na fase estacionária e C_{FM} é a concentração do soluto na fase móvel.

Os fatores que influenciam a distribuição (K) de um soluto no sistema cromatográfico são [7]:

- **forças intermoleculares entre o(s) soluto(s) e as fases móvel e estacionária;**
- **composição e propriedades da fase móvel;**
- **tipo e propriedades da fase estacionária;**
- **temperatura.**

1.3.1- Forças intermoleculares entre o soluto e a fase móvel:

Quando uma fase móvel fornece pequenos valores de k (fator de retenção; equação 3) para um determinado soluto, significa que esta fase móvel interage fortemente com as moléculas deste soluto. Como causa, este solvente tem uma grande capacidade de dissolver o soluto da amostra [4]. No contrário, as moléculas deste soluto terão uma maior preferência pela fase estacionária, aumentando o valor de k .

As principais interações existentes entre as moléculas do solvente e o soluto são:

- **dispersão;**
- **dipolo;**
- **pontes de hidrogênio e**
- **interação dielétrica.**

1.3.2 - Composição e propriedades da fase móvel:

Além das propriedades da fase móvel, discutidas anteriormente na seção 1.2, a composição da fase móvel, ou seja, a porcentagem do solvente orgânico na fase móvel, tem influência significativa numa separação.

Em Cromatografia Líquida de fase reversa, a fase móvel é composta por um modificador orgânico (solvente orgânico) relativamente polar e água. A variação da quantidade do modificador orgânico altera a polaridade da fase móvel, que estabelece então um equilíbrio químico do soluto entre as fases móvel e estacionária (equação 7). Tipicamente, um aumento de 10% do modificador orgânico diminuirá o fator de retenção (k) de um soluto num fator de 2 a 3 [9]. Como pode-se observar na figura 6, a mudança na concentração do modificador orgânico na fase móvel altera visivelmente o tempo de retenção dos solutos, até invertendo a ordem de eluição em certos casos.

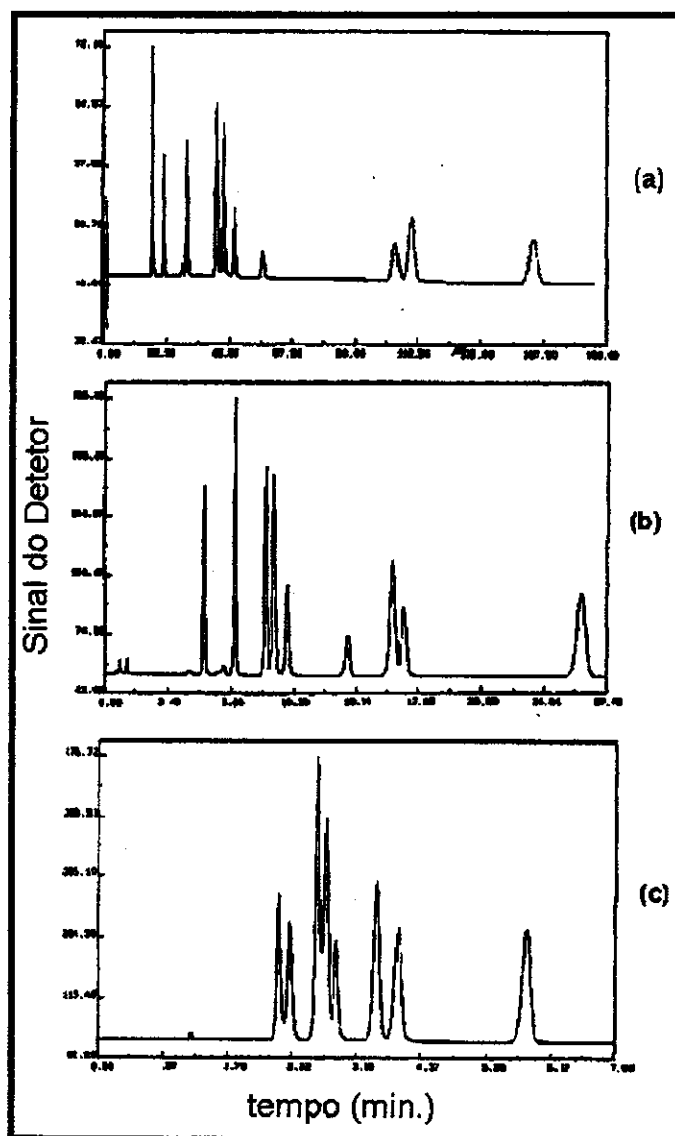


Figura 6 - Separação de nitrocompostos aromáticos.

(a) metanol:água 30:70 (v/v);(b)metanol:água 50:50 (v/v); (c)metanol:água 70:30 (v/v). [9]

Os modificadores orgânicos mais usados para alterar a seletividade da fase móvel são metanol, acetonitrila e tetraidrofurano. A seletividade destes eluentes é a habilidade de cada um em modificar o fator de separação α de dois ou mais compostos presentes na amostra [10]. A mudança na seletividade da fase móvel resulta quando os diferentes tipos de interações entre as moléculas do solvente e do soluto também mudam. Assim, a substituição do modificador orgânico da fase móvel altera o tipo de interação e, conseqüentemente, a seletividade da fase móvel [4].

Para estabelecer uma relação entre as diferentes seletividades das fases móveis criou-se o conceito de *parâmetro de polaridade* P' , que é a medida do poder de solvatação de um solvente. O parâmetro é baseado em três espécies de solventes com diferentes características:

- x_b - **parâmetro de basicidade (receptor de prótons): medida da tendência de formação de pontes de hidrogênio;**
- x_d - **parâmetro de acidez (doador de prótons): medida da tendência de formação de pontes de hidrogênio;**
- x_n - **parâmetro de dipolo: medida da grandeza do dipolo.**

Baseado nestes três parâmetros, os solventes podem ser classificados de acordo com suas características em um triângulo (figura 7) de seletividade [11, 12], e os solventes de seletividades similares são agrupados (tabela 4). A tabela 5 apresenta a polaridade (P') de alguns solventes mais usados em cromatografia líquida.

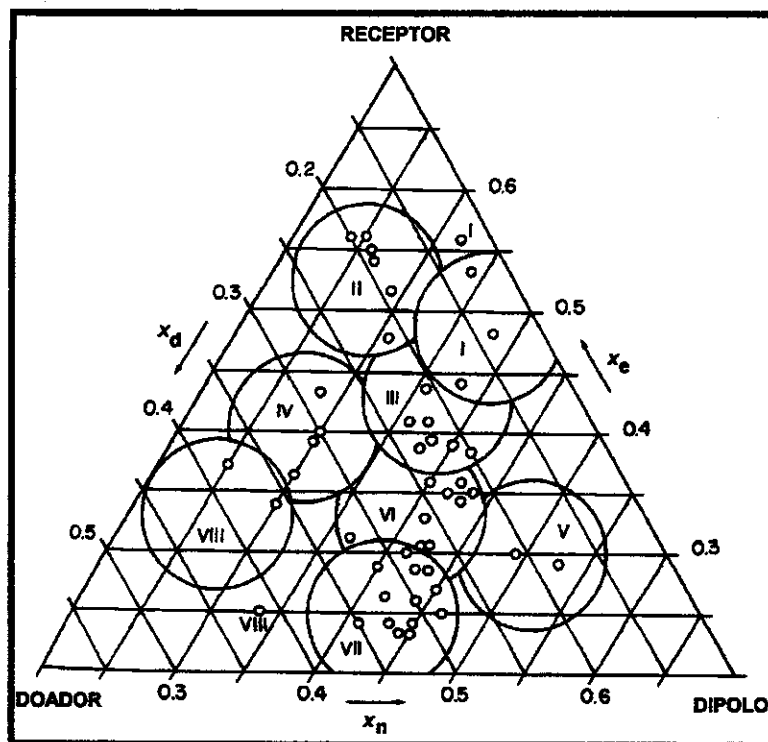


Figura 7 - Triângulo de seletividade para solventes [4].

Tabela 4 - Grupos de solventes com seletividades similares.

Grupo	Solventes
I	éteres alifáticos e trialkilaminas
II	álcoois alifáticos
III	derivados de piridina, THF, amidas (exceto formamida), éteres de glicol, sulfóxidos.
IV	glicóis, álcool benzílico, ácido acético e formamida.
V	diclorometano, cloreto de etileno.
VI	cetonas e ésteres alifáticos, dioxano, nitrilas e anilina.
VII	hidrocarbonetos aromáticos, nitrocompostos, éteres aromáticos e halogenados aromáticos.
VIII	álcoois fluoretados, água, clorofórmio.

Tabela 5 - Parâmetro de polaridade P' de alguns solventes.

Solvente	P'	x_e	x_d	x_n	Grupo
benzeno	2,7	0,23	0,32	0,45	VII
éter dietílico	2,8	0,53	0,13	0,34	I
diclorometano	3,1	0,29	0,18	0,53	V
isopropanol	3,9	0,55	0,19	0,27	II
tetraidrofurano	4,0	0,38	0,20	0,42	III
clorofórmio	4,1	0,25	0,41	0,33	VIII
etanol	4,3	0,52	0,19	0,29	II
acetona	5,1	0,35	0,23	0,43	VI
metanol	5,1	0,48	0,22	0,31	II
acetonitrila	5,8	0,31	0,27	0,42	VI
ácido acético	6,0	0,39	0,31	0,30	IV
água	10,2	0,37	0,37	0,25	VIII

Para qualquer solvente da tabela 5, o somatório de x_e , x_d e x_n é sempre igual a 1. No caso do clorofórmio, por exemplo, as propriedades de suas interações polares serão de 25% de receptor de prótons, 41% de doador de prótons e 33% de interações de dipolo.

Se qualquer valor de x entre dois solventes difere por um valor menor que 0,03 (3%), então a seletividade entre eles não é tão acentuadamente diferente, como no caso de metanol e etanol, onde x_n difere de apenas 0,02 (2%) [10].

1.3.3 - Tipos e propriedades da fase estacionária:

As fases estacionárias quimicamente ligadas são, atualmente, as mais utilizadas em cromatografia líquida de fase reversa [4, 13, 14] e podem ter diferentes polaridades, dependendo do grupo funcional com o qual se modificou a superfície da sílica [10]. A tabela 6 mostra diferentes tipos de grupos funcionais de sílicas quimicamente modificadas.

Tabela 6 - Grupos funcionais de sílicas quimicamente modificadas [10].

Grupo	Fórmula	Grupo	Fórmula
Octadecil	— (CH ₂) ₁₇ CH ₃	Cicloexil	— C ₆ H ₁₁
Octil	— (CH ₂) ₇ CH ₃	Fenil	— C ₆ H ₅
Hexil	— (CH ₂) ₅ CH ₃	Amino	— NH ₂
Dimetil	= Si(CH ₃) ₂	Nitro	— NO ₂
Trimetil	— Si(CH ₃) ₃	Nitrila	— CN

A mudança de coluna por qualquer outra com um diferente grupo funcional muda, claramente, a seletividade da separação. A figura 8 mostra um exemplo da separação de uma amostra com cinco componentes em três diferentes colunas cromatográficas.

As propriedades da fase estacionária também podem afetar na separação cromatográfica. Estas incluem principalmente o tamanho e o formato das partículas que compõem a fase estacionária.

Atualmente, a preferência tem sido o uso de fases estacionárias com partículas com diâmetro menor ou igual a 5 µm. Essa preferência vem do fato de que partículas menores possibilitam separações mais rápidas, já que a difusão das moléculas do soluto em partículas de 5 µm, ou menores, é mais rápida do que em partículas maiores, como as de 10 µm [15]. A figura 9 mostra

a separação do aspartame e seus metabólitos com colunas de diferentes tamanhos de partículas.

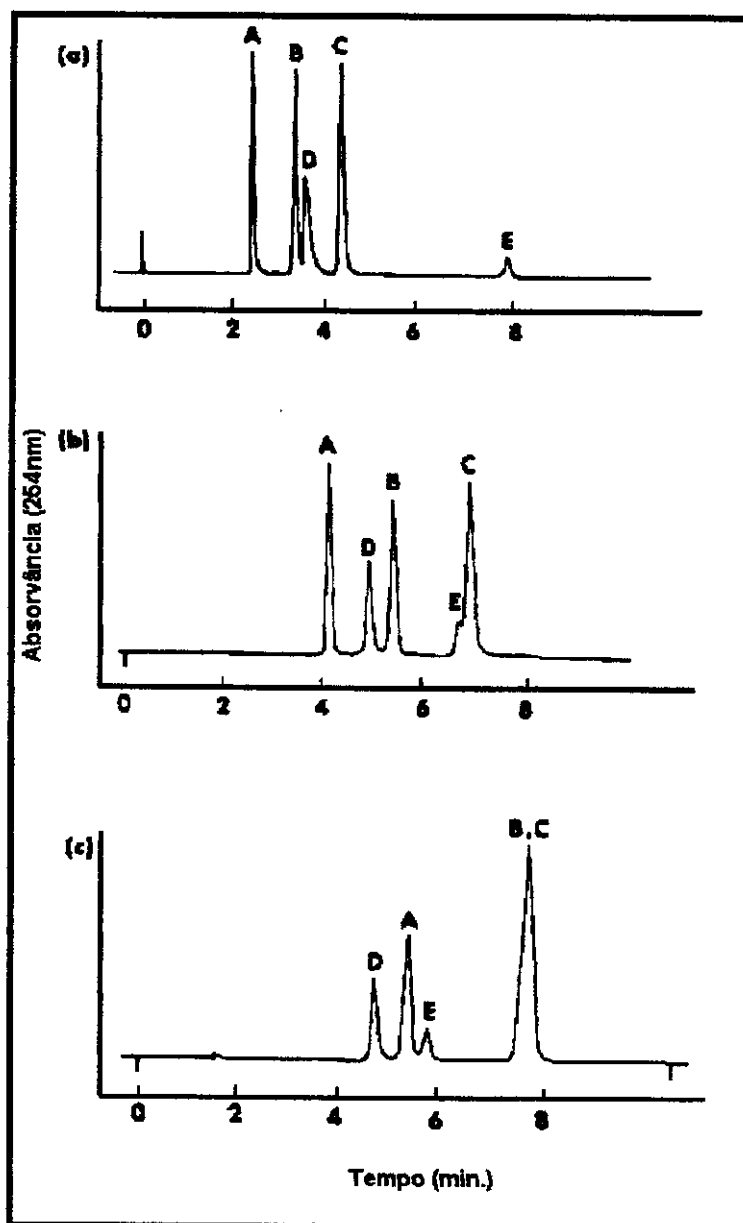


Figura 8 - Separação cromatográfica com diferentes colunas.

A = cortisona, B = dexametasona, C = corticosterona, D = o-nitrofenol e E = flúorbenzeno. (a) coluna C18 (octadecil), acetonitrila:água (b) 36:64 (v/v); coluna C6 (fenil), acetonitrila:água 29:71 (v/v); (c) coluna CN (nitrila), acetonitrila:água 20:80 (v/v) [9].

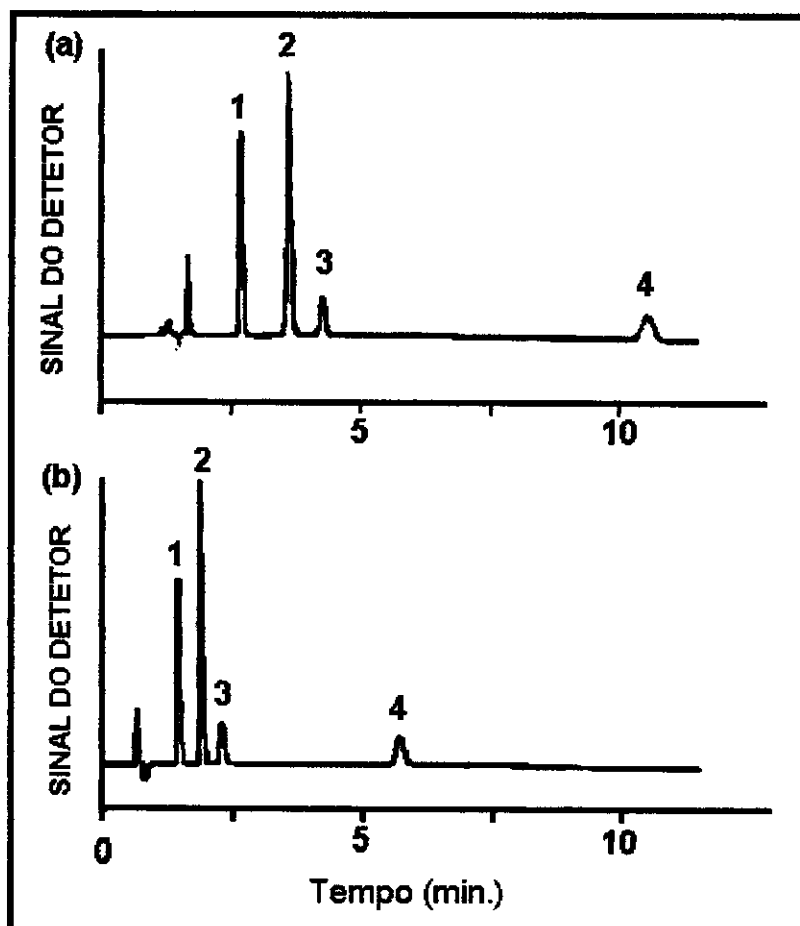


Figura 9 - Separação cromatográfica usando fases estacionárias com (a) 5 e (b) 3,5 μm de diâmetro.

(1) fenilalanina, (2) ácido 5-benzil-3,6-dioxe-2-piperarazinoacético, (3) ácido fenilalanina aspártico, (4) aspartame [15].

Já quanto ao formato, as partículas podem ser esféricas ou irregulares. Independente do formato, colunas de mesmo tamanho recheadas com ambas as partículas podem fornecer a mesma eficiência. No entanto, colunas com as partículas esféricas podem gerar menor resistência à passagem da fase móvel e, conseqüentemente, menor pressão (*back pressure*) [4].

1.3.4 - Efeito da temperatura sobre a separação:

Vários autores descrevem o efeito da temperatura e sua utilização como um dos parâmetros para a otimização da separação cromatográfica [10, 15-20].

O efeito da temperatura se observa sobre a redução da viscosidade da fase móvel, tornando mais efetiva a troca de massa do soluto entre as fases móvel e estacionária. Além disso, a difusão mais rápida do soluto na fase estacionária pode aumentar a eficiência da separação [1, 10].

A retenção de um soluto no processo isocrático pode ser verificada empiricamente pela equação [16, 17]:

$$\log k = a + \frac{c}{T} \quad (8)$$

onde a e c são constantes para um dado soluto e T é a temperatura absoluta (Kelvin). Como pode-se perceber, o aumento na temperatura reduz o fator de retenção do soluto. Além da diminuição da viscosidade da fase móvel, o aumento da temperatura provoca a diminuição no espaçamento (resolução) entre os picos [15], podendo ser um fator aplicável para a otimização nas separações cromatográficas, e também um aumento da solubilidade do soluto na fase móvel, sendo também um motivo pelo qual diminui-se o tempo de separação de uma mistura.

No entanto, algumas desvantagens devem ser consideradas no aumento da temperatura numa separação cromatográfica [10]:

- o solvente ou os componentes da amostra podem ser mais facilmente decompostos;
- a pressão de vapor do solvente aumenta, aumentando assim o risco de bolhas no detetor;
- a solubilidade da sílica aumenta em todas as fases móveis com o aumento da temperatura. A temperatura máxima é cerca de 120 °C para colunas de sílica e 80 °C para fases quimicamente ligadas.

Mesmo considerando estes fatos, deve-se levar em consideração de que o aumento da temperatura de separação melhora a repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados, além de permitir trabalhar-se em vazões mais elevadas, onde seria mais difícil em temperatura ambiente já que a pressão no sistema seria maior, diminuindo o tempo total de análise.

1.4 - Ajuste da polaridade da fase móvel:

A polaridade da fase móvel pode ser calculada a partir da polaridade e concentração de cada componente presente na fase através da equação [4]:

$$P' = \phi_1 P'_1 + \phi_2 P'_2 + \dots + \phi_n P'_n \quad (9)$$

onde ϕ representa a fração do solvente e P' é o parâmetro de polaridade do solvente (seção 1.3.2). Uma vez estabelecida a composição da fase móvel, a polaridade da mesma pode então ser calculada.

No entanto, a seletividade da fase móvel pode não ser a ideal e a mudança do modificador orgânico pode ser necessária a fim de obter uma melhor separação dos picos cromatográficos. A partir do triângulo de seletividade (figura 7), geralmente, escolhe-se o modificador orgânico (solvente) de outro grupo de vértice oposto ao do solvente anterior e, a partir daí, calcula-se a nova composição da fase móvel que tenha polaridade similar (ou seja, mesma força cromatográfica ou força de eluição) mas com seletividade diferente [4, 9]. A partir da equação 9, pode-se derivar outra equação pela qual pode-se obter fases móveis de polaridades similares:

$$\phi_2 = \phi_1 \frac{(P'_w - P'_1)}{(P'_w - P'_2)} \quad (10)$$

onde ϕ_1 é a fração do modificador orgânico da fase móvel inicial, ϕ_2 é a fração do modificador orgânico da fase móvel de seletividade diferente, P'_w é a polaridade da água ($P'_w = 10,2$), P'_1 é a polaridade do modificador orgânico da fase móvel inicial e P'_2 é a polaridade do modificador orgânico de seletividade diferente.

No entanto, os mesmo autores [4, 9] descrevem outra equação e valores de polaridades diferentes para os solventes orgânicos usados em cromatografia líquida de fase reversa. O novo parâmetro de polaridade é definido como S (força do solvente), sendo que os valores para diferentes solventes são dados na tabela 7.

Tabela 7 - Força de solventes (S).

Solvente	S	Solvente	S
água	0,0	dioxano	3,5
metanol	3,0	etanol	3,6
acetonitrila	3,1	isopropanol	4,2
acetona	3,4	tetraidrofurano	4,4

A partir dos valores da tabela 7, pode-se calcular a composição da fase móvel com seletividade diferente através da equação:

$$\phi_2 = \phi_1 \frac{S_1}{S_2} \quad (11)$$

Mesmo com duas equações e valores de polaridades diferentes, ambas devem ser avaliadas no caso em que há necessidade de mudança de seletividade da fase móvel. A figura 10 mostra a separação cromatográfica utilizando-se THF e metanol como modificadores orgânicos de fases móveis com a mesma força cromatográfica. Pode-se perceber claramente a mudança na separação dos picos.

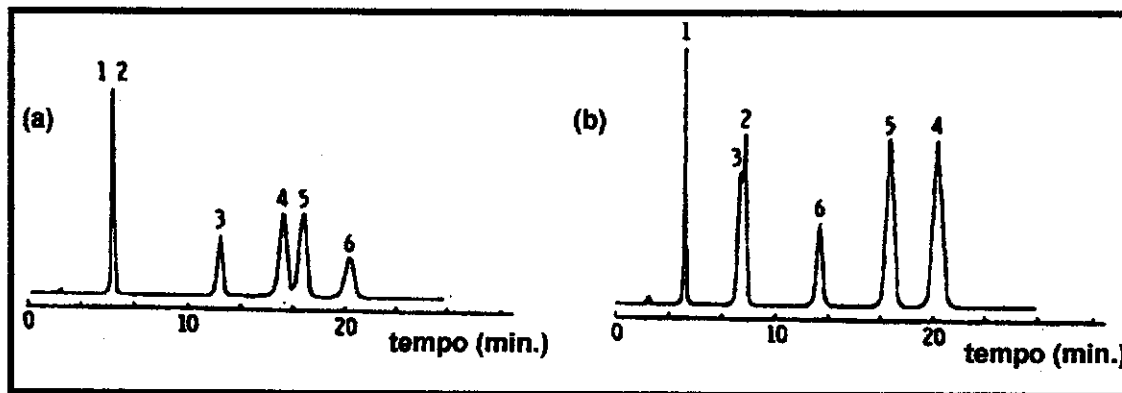


Figura 10 - Efeito do modificador orgânico na separação dos picos. (a) MeOH:H₂O 50:50 (v/v). (b) THF:H₂O 32:68 (v/v). 1 = álcool benzílico, 2 = fenol; 3 = fenil-propanol; 4 = 2,4-dimetil-fenol; 5 = benzeno; 6 = dietilftalato [9].

1.5 - Métodos quimiométricos de planejamento e otimização (Planejamento Fatorial):

Dentre os métodos quimiométricos existentes de otimização e planejamento experimental, encontra-se o planejamento fatorial. O planejamento fatorial permite, simultaneamente, estudar a influência de uma ou mais variáveis sobre seu(s) resultado(s) ou resposta(s) [21].

O planejamento fatorial é estabelecido a partir de fatores e níveis pré determinados pelo experimentador, atribuindo k fatores e n níveis e fazendo todas as combinações possíveis entre níveis e fatores [21, 22]. Supondo dois fatores ($k = 2$) e dois níveis ($n = 2$) teremos um planejamento fatorial 2^2 (k^n). Estabelecendo todas as combinações possíveis teremos $2 \times 2 = 4$ ensaios diferentes.

Nos planejamentos de dois níveis costuma-se identificá-los como níveis superior e inferior, os quais podem ser quantitativos ou qualitativos. Normalmente, atribui-se para o nível superior (ou nível alto) o sinal (+) e, para o nível inferior (ou nível baixo), o sinal (-) [21].

Os resultados de um planejamento fatorial 2^2 , apresentados na forma de diagrama, apresentam o formato de um quadrado (figura 11) e, a partir dele pode-se estudar o efeito da variação dos fatores e níveis estabelecidos.

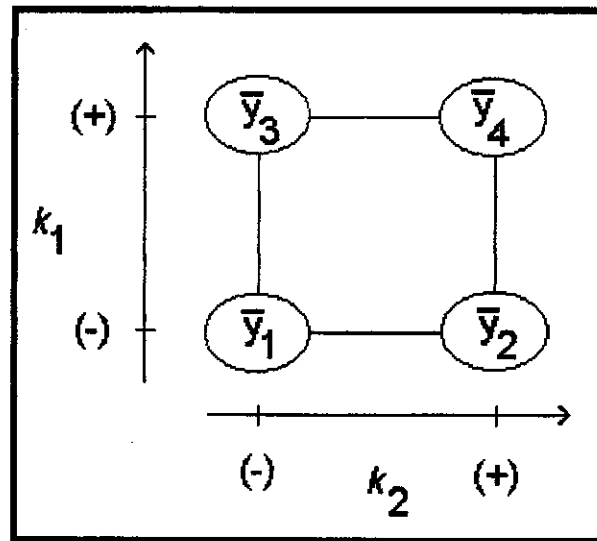


Figura 11 - Fatores e níveis de um planejamento fatorial 2^2 .

Os resultados em caso de replicatas são colocados apenas o valor médio de cada resposta. A partir daí podemos estudar os efeitos dos níveis e fatores sobre os resultados (respostas). No caso de um planejamento fatorial 2^2 , teremos os efeitos principais, representados por k_1 e k_2 e o efeito de interação k_1k_2 . Os efeitos principais são calculados pelas equações:

$$k_1 = \bar{y}_+ - \bar{y}_- = \frac{1}{2}(\bar{y}_3 + \bar{y}_4) - \frac{1}{2}(\bar{y}_1 + \bar{y}_2) \quad (12)$$

$$k_2 = \bar{y}_+ - \bar{y}_- = \frac{1}{2}(\bar{y}_2 + \bar{y}_4) - \frac{1}{2}(\bar{y}_1 + \bar{y}_3) \quad (13)$$

E o efeito de interação é calculado pela equação:

$$k_1k_2 = \frac{1}{2}(\bar{y}_1 + \bar{y}_4) - \frac{1}{2}(\bar{y}_2 + \bar{y}_3) \quad (14)$$

Acrescentando mais um fator ao planejamento fatorial anterior, k_3 , tem-se um planejamento fatorial 2^3 . Com isso o planejamento fatorial completo passará a necessitar a realização de $2^3 = 8$ ensaios. A tabela 8 mostra a combinação de todos os ensaios e a figura 12 o diagrama do fatorial 2^3 com as respostas.

Tabela 8 - Combinação dos ensaios de um planejamento fatorial 2^3 .

Ensaio	k_1	k_2	k_3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

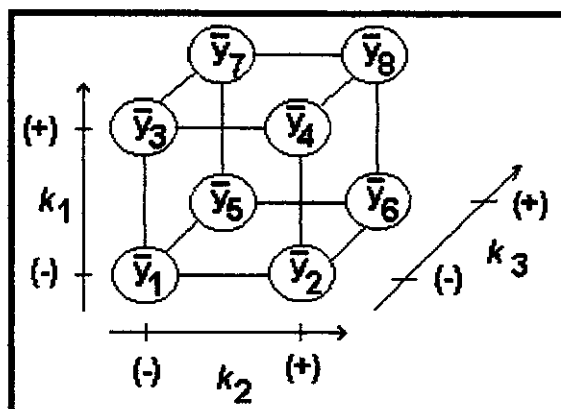


Figura 12 - Fatores e níveis de um planejamento fatorial 2^3 .

No caso de um planejamento fatorial 2^3 , além dos efeitos principais k_1 , k_2 e k_3 , teremos os efeitos de interação de dois fatores k_1k_2 , k_1k_3 e k_2k_3 e o efeito de interação de três fatores $k_1k_2k_3$. Todos estes efeitos podem também ser calculados a partir de programas computacionais [21, 22].

Para verificar a validade do planejamento fatorial, pode-se calcular o erro dos seus efeitos principais e de interação e aplicar o teste de Student (teste t). Supondo que se tenha feito duplicata para todos os ensaios, a estimativa combinada da variância de uma observação individual é dada por:

$$V(y) = s^2 = \sum \frac{d_i^2}{2N} \quad (15)$$

onde d_i é a diferença entre as duas observações de cada ensaio realizado e N o número totais de ensaios, no caso $N = 8$.

A partir da variância individual $V(y)$, calcula-se a variância do efeito dada por:

$$V(efeito) = \frac{s^2}{4} \quad (16)$$

Para o erro do efeito, calcula-se por:

$$s(efeito) = [V(efeito)]^{1/2} \quad (17)$$

O teste t é aplicado sobre o erro do efeito, $s(efeito)$, e supondo um nível de confiança de 95%, o efeito é considerado estatisticamente significativo se:

$$efeito > t_{v,95\%} \cdot s(efeito) \quad (18)$$

onde $t_{v,95\%}$ é o valor do t de Student para v graus de liberdade com um nível de confiança de 95%.

A análise do fatorial também pode ser feita através de gráficos normais, como na figura 13, obtidos também por programas computacionais [22]. Os efeitos considerados significativos são representados pelos pontos mais afastados da reta. O efeito é tanto mais significativo quanto mais estiver afastado desta reta. Na mesma figura 13, o eixo das ordenadas corresponde a $N = 9$ na tabela E do apêndice da referência de Box, Hunter e Hunter [23], que indica a localização das probabilidades acumuladas correspondentes a uma amostra de 9 elementos.

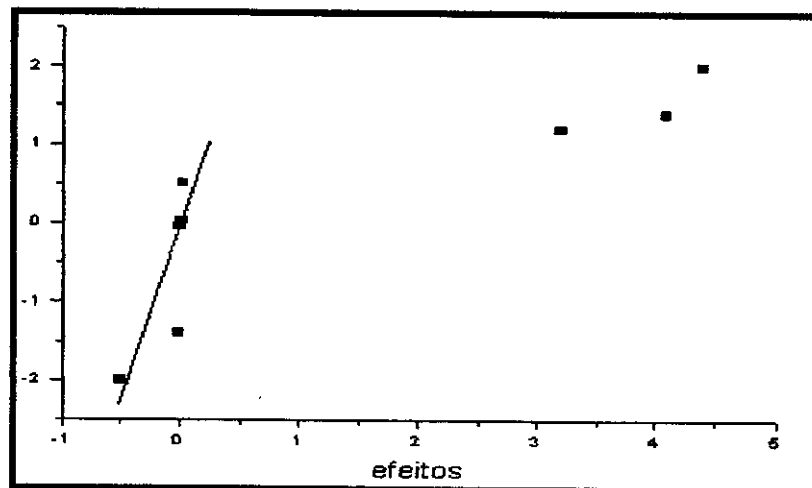


Figura 13 - Gráfico normal dos efeitos.

2 - OBJETIVOS:

Os objetivos delineados para esse trabalho foram:

- Determinar os parâmetros físicos-químicos relevantes à cromatografia líquida para misturas de etanol:água.
- Otimizar as separações cromatográficas utilizando etanol:água como fase móvel em função da temperatura e composição da fase móvel;
- Avaliar o comportamento do etanol como modificador orgânico da fase móvel nas separações cromatográficas frente a diferentes fases estacionárias (C8 e C18);
- Comparar os principais modificadores orgânicos, ou seja, metanol e acetonitrila, com o etanol em relação à resolução (R_s), fator de assimetria (A_s), fator de retenção (k) e tempo de análise (t_R) dos picos cromatográficos.
- Verificar a influência da temperatura nas separações cromatográficas utilizando etanol:água como fase móvel.
- Verificar a estabilidade das fases estacionárias (C8 e C18) frente ao uso de etanol:água como fase móvel.

3 - PARTE EXPERIMENTAL:

3.1 - Espectros UV-VIS:

A primeira etapa do trabalho consistiu em verificar algumas características físico-químicas descritas no item 1.2 (seleção do solvente em CLAE). Assim, foram obtidos os espectros de absorção UV-VIS do etanol grau HPLC, além do metanol (Merck, grau HPLC), acetonitrila (grau HPLC) e tetraidrofurano (PA). Utilizou-se um espectrofotômetro UV-VIS por arranjo de diodos, marca Hewlett Packard, modelo 8452A.

3.2 - Viscosidade das misturas etanol:água:

Para verificar a viscosidade, utilizou-se um viscosímetro de Ostwald. Foi determinada a viscosidade da mistura de etanol:água em diversas composições (5% a 95% de etanol - v/v), variando-se a temperatura de 25°C a 70 °C.

3.3 - Fase estacionária:

Foram utilizadas fases comerciais C8 e C18, marca Rainin, partículas esféricas com diâmetro de partícula de 5 µm. As condições para o recheio das colunas estão na tabela 9, selecionados baseados em trabalhos recentes no Laboratório de Cromatografia Líquida [24]. Foram recheadas quatro colunas para trabalho, todas com dimensões de 150 mm x 3.0 mm (d.i.), utilizando uma bomba Haskel. Após recheadas, as colunas foram condicionadas a uma vazão de 0,2 mL min⁻¹ durante 5 horas antes de qualquer injeção.

Tabela 9 - Condições de recheio das colunas cromatográficas C8 e C18.

Coluna	Tipo de fase estacionária	Solvente de suspensão	g de FE/mL de solvente	tempo de agitação da suspensão	Pressão de enchimento (psi)	Solvente propulsor
1	C18	CCl ₄	1,6/8,0	16h	5.500	metanol
2	C18	CCl ₄	1,6/8,0	16h	5.500	metanol
3	C8	CCl ₄	1,6/8,0	3h	7.000	metanol
4	C8	CCl ₄	1,6/8,0	3h	7.000	metanol

3.4 - Preparação da mistura padrão:

Preparou-se uma mistura padrão contendo:

- Acetona - 0,19 mol L⁻¹;
- Benzonitrila - 0,012 mol L⁻¹;
- Benzeno - 0,018 mol L⁻¹;
- Tolueno - 0,03 mol L⁻¹;
- Naftaleno - 0,002 mol L⁻¹.

3.5 - Condições operacionais do sistema cromatográfico:

Para obtenção dos cromatogramas, foi utilizado um sistema Waters com duas bombas modelo 510 controladas por um controlador automático de gradiente Waters, modelo 680; detetor UV-VIS por arranjo de diodos modelo 911 (com programa PDA) e injetor Rheodyne, modelo 8125 com amostrador (alça) de 10 µL. Um forno Waters, modelo CHM, com controlador de temperatura Waters, modelo TCM, foi utilizado para acondicionamento da coluna cromatográfica a diversas temperaturas.

Todos os solventes utilizados foram da Merck, grau HPLC, e a água obtida de um sistema Milli-Q (Millipore). O comprimento de onda de trabalho do detetor foi de 254 nm.

3.6 - Otimização das condições de separação:

Com relação à separação cromatográfica, foram testadas misturas de etanol:água como fase móvel, para encontrar a melhor composição que separasse a mistura padrão. Como método de otimização experimental, usou-se um planejamento fatorial, cujos resultados foram calculados a partir do programa FATORIAL [21]. Os ensaios foram avaliados em relação à eficiência (N/m), resolução (R_s) dos picos, calculados para o par tolueno/naftaleno, tempo de análise (t_R) que pode ser associado ao tempo de retenção do soluto mais retido (naftaleno), fator de assimetria (A_s) a 10% da altura do pico e fator de retenção (k), somente para o naftaleno. Os níveis e fatores são dados na tabela 10.

Tabela 10 - Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3 .

FATORES	NÍVEIS/coluna C18		NÍVEIS/coluna C8	
	(-)	(+)	(-)	(+)
(1) temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30	50	30	50
(2) % de etanol	60	70	55	60
(3) vazão (mL min^{-1})	0,1	0,2	0,1	0,2

Outro fatorial, agora 2^2 , foi realizado para tentar aperfeiçoar alguns dos parâmetros. Os níveis e fatores são dados na tabela 11. O fator vazão da fase móvel foi mantido constante ($0,15 \text{ mL min}^{-1}$ para coluna C18 e $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ para coluna C8).

Tabela 11 - Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^2 .

FATORES	NÍVEIS/coluna C18		NÍVEIS/coluna C8	
	(-)	(+)	(-)	(+)
(1) temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30	40	40	50
(2) % de etanol	60	65	50	55

3.7 - Otimização da vazão da fase móvel através da curva de van Deemter:

Uma comparação dos diferentes solventes orgânicos foi realizada através da otimização da separação pela construção da curva de van Deemter para cada fase móvel, a fim de se obter a vazão ótima de trabalho na qual a eficiência da coluna atinge um valor máximo. Dessa forma, variou-se a vazão da fase móvel, calculando a eficiência obtida em cada vazão.

A composição da mistura etanol:água foi inicialmente avaliada pelos resultados obtidos com o planejamento fatorial, ou seja, a porcentagem de etanol na fase móvel que forneceu um valor de resolução (R_s) entre os picos (naftaleno/tolueno) correspondente a uma separação até à linha de base. A composição das misturas das fases móveis utilizadas para as diferentes colunas é dada na tabela 12. Todas as fases móveis possuem a mesma força cromatográfica, calculada utilizando a equação 11 [4, 9].

Como as fases móveis contendo metanol e acetonitrila possuem menor viscosidade, a curva de van Deemter foi realizada à temperatura de 25 °C enquanto que, para etanol:água, foram feitas duas curvas: uma a 25 °C e outra a 40 °C, a última como forma de diminuir a viscosidade.

Tabela 12 - Composição das fases móveis.

FASE MÓVEL	COMPOSIÇÃO(v /v) COLUNA C18	COMPOSIÇÃO (v/v) COLUNA C8
etanol:água	60:40	55:45
metanol:água	72:28	66:34
acetonitrila:água	70:30	64:36

3.8 - Efeito da temperatura sobre a separação:

Como forma de verificar o efeito da variação da temperatura sobre a separação cromatográfica, foram realizadas diversas corridas à vazão constante de 0,2 mL min⁻¹ para ambas as colunas, C18 e C8. A variação de temperatura foi feita graças a utilização de um forno para acondicionamento da coluna cromatográfica nas temperaturas de 25 a 60 °C. A composição das fases móveis, ou seja, etanol:água, metanol:água e acetonitrila:água, foram as mesmas utilizadas no procedimento 3.7 (tabela 12).

3.9 - Teste de estabilidade das fases estacionárias frente ao uso de etanol:água como fase móvel:

Para verificar a estabilidade da fase estacionária frente ao uso de etanol:água, as colunas cromatográficas foram deixadas continuamente sobre a eluição da fase móvel a uma vazão de, em média, $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Para a coluna C18 foi utilizado EtOH:H₂O 60:40 (v/v) e, para a coluna C8, EtOH:H₂O 55:45 (v/v).

A estabilidade foi avaliada, através dos parâmetros cromatográficos já estabelecidos (N/m , R_s , A_s , e k), ao injetar a mistura padrão (item 3.4), a uma vazão de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. As colunas foram avaliadas após passagem de 250 volumes de fase móvel até 10.000 volumes de fase móvel na temperatura de 40°C . Em seguida, a temperatura foi aumentada para 60°C onde foi feita a passagem de mais 5.000 volumes de fase móvel, totalizando 15.000 volumes de fase móvel. Para a coluna C18 foi utilizado EtOH:H₂O 60:40 (v/v) e, para a coluna C8, EtOH:H₂O 55:45 (v/v).

O volume de fase móvel, V_M , pode ser calculado através da equação:

$$V_M = t_M \cdot F \quad (19)$$

onde, t_M é o tempo de retenção de um soluto pouco retido na fase estacionária [5] e F é a vazão da fase móvel. A vazão ótima para obtenção dos cromatogramas foi estabelecida através de curvas de van Deemter.

3.10 - Separação de uma mistura de componentes básicos:

Preparou-se uma mistura contendo anilina ($0,009 \text{ mol L}^{-1}$) e N,N-dimetilanilina ($0,006 \text{ mol L}^{-1}$), como forma de verificar o efeito do etanol na separação de compostos básicos.

A composição das fases móveis utilizadas, calculada utilizando a equação 11, é dada na tabela 13 e foram utilizadas tanto para a coluna de fase C18 como para a coluna de fase C8.

Tabela 13- Composição das fases móveis.

Fase Móvel*	COMPOSIÇÃO
EtOH:H ₂ O	70:30
MeOH:H ₂ O	85:15
ACN:H ₂ O	80:20

* FM de mesma força cromatográfica [9];

* $F = 0,2 \text{ mL min}^{-1}$.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES:

4.1 - Parâmetros físico-químicos:

A figura 14 apresenta o espectro de absorção no UV-VIS para duas amostras de lotes diferentes de etanol e a figura 15 mostra os espectros de absorção no UV-VIS para os diversos solventes orgânicos utilizados usados em CL.

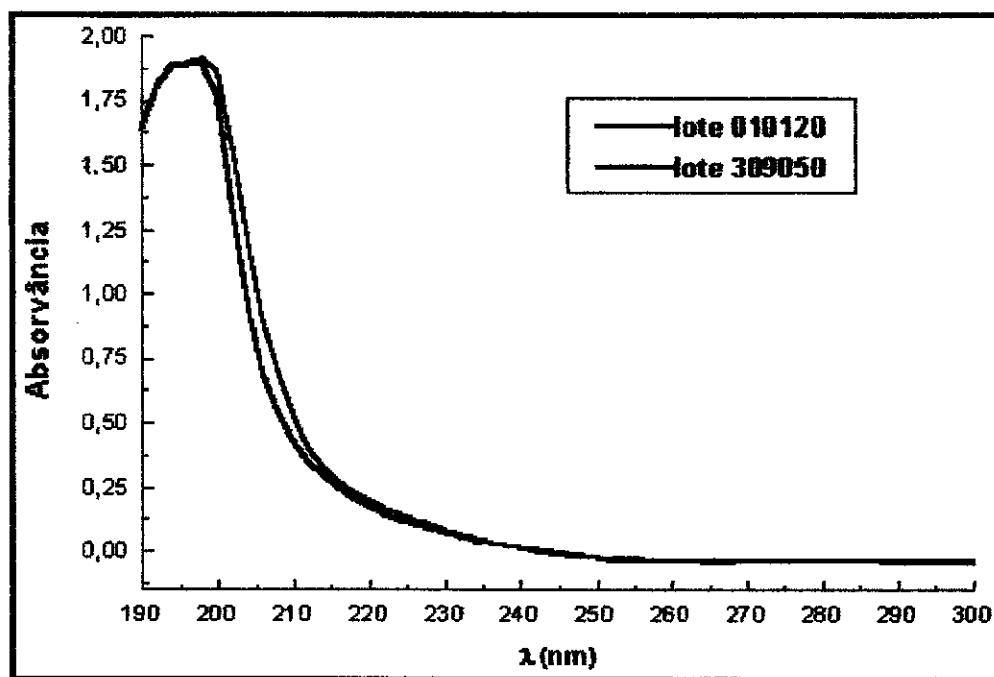


Figura 14 - Espectro de absorção no UV-VIS de duas amostras de lotes diferentes de etanol (Merck).

Segundo o espectro da figura 14, não houve variação entre os dois lotes de fabricação, ou seja, a utilização de lotes diferentes de etanol não afetaria na reprodutibilidade dos resultados cromatográficos.

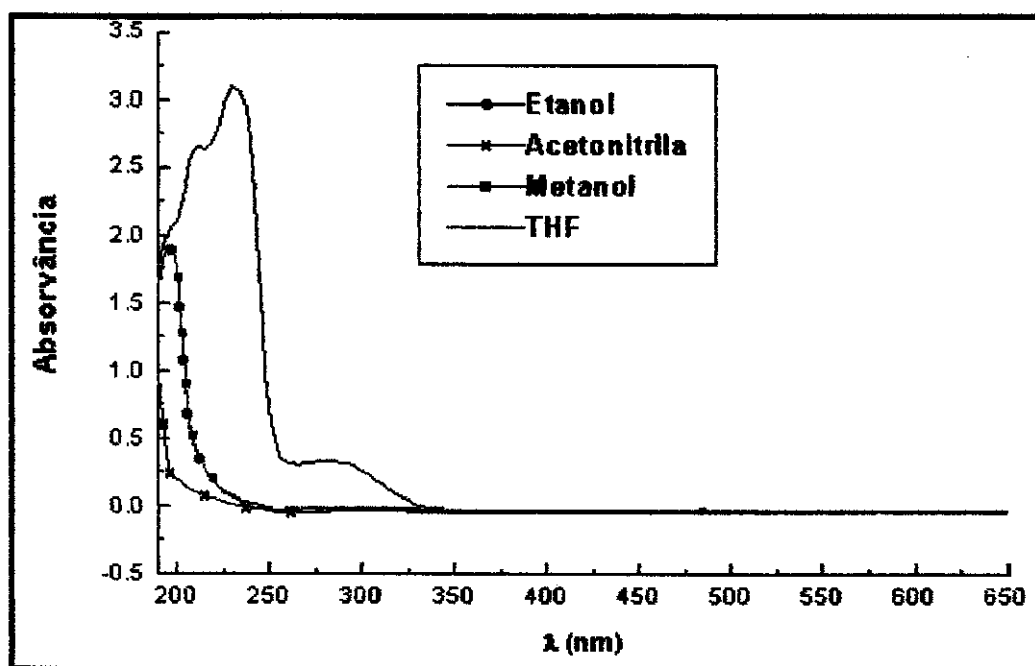


Figura 15 - Espectro de absorção no UV-VIS de alguns solventes orgânicos.

Os espectros da figura 15 mostram um comportamento muito parecido entre etanol e metanol. A acetonitrila é o solvente orgânico com menor absorção na região estudada (190 - 650 nm), ou seja, sua aplicabilidade com o detetor UV-VIS é bem maior. Os espectros destes solventes são bastante semelhantes aos encontrados na figura 1. Já o THF é o solvente que tem maior absorção, possivelmente por sua oxidação a peróxido.

A curva de viscosidade das misturas de etanol:água é apresentada na figura 16. Como a viscosidade decresce com a temperatura, temperaturas maiores indicam ser melhores para a sua utilização. Notar que, a 70 °C, a viscosidade é bem próximo a recomendada [4]. Por outro lado, a curva da viscosidade a 30 °C é bem similar a dos solventes metanol e tetraidrofurano a 20 °C (figura 2).

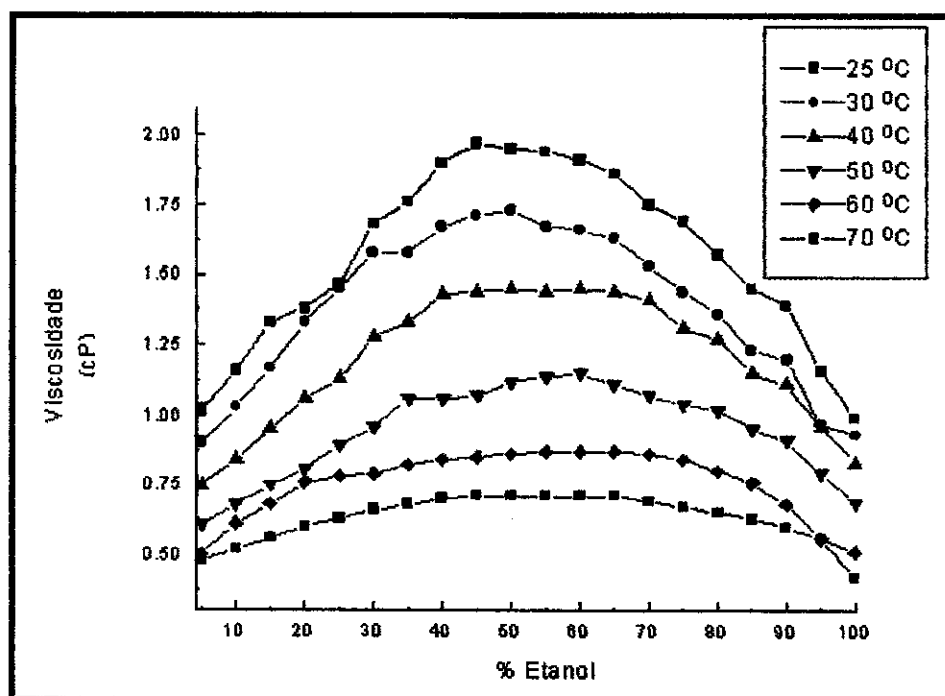


Figura 16 - Curva de viscosidade de misturas etanol:água a diferentes temperaturas.

4.2 - Resultados do planejamento fatorial obtidos com a coluna C18:

Os resultados do planejamento fatorial 2^3 obtidos com a coluna recheada com a fase estacionária comercial C18 são dados a na tabela 14. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os níveis e fatores são dados na tabela 10. Para este procedimento foi utilizada a coluna 1 (tabela 9).

Tabela 14 - Resultados obtidos com o planejamento fatorial 2^3 (coluna C18-1).

Ensaio	Combinação*			N/m	R_s	A_s	k	t_R (naf)
	(1)	(2)	(3)	(naf)	(naf/tol)	(naf)	(naf)	min
1	-	-	-	24.000 $\pm$ 700	3,0 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,0	49,3 $\pm$ 0,1
2	+	-	-	24.000 $\pm$ 3.200	2,5 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,4	42,2 $\pm$ 3,1
3	-	+	-	22.300 $\pm$ 440	1,9 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,1	31,3 $\pm$ 1,2
4	+	+	-	26.400 $\pm$ 120	1,6 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,0	26,6 $\pm$ 0,1
5	-	-	+	23.000 $\pm$ 2.500	2,8 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,1	23,6 $\pm$ 0,2
6	+	-	+	25.000 $\pm$ 1.700	2,4 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,3
7	-	+	+	21.000 $\pm$ 2.000	1,8 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1	15,1 $\pm$ 0,6
8	+	+	+	22.000 $\pm$ 1.100	1,4 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,1	12,9 $\pm$ 0,0

(*) ver tabela 10. naf = naftaleno; tol = tolueno.

Na tabela 15, encontra-se os valores das estimativas dos efeitos e o erro dos efeitos (calculado através das equações 15 a 17).

Tabela 15 – Estimativas dos efeitos (da tabela 14).

Efeito	N/m (naf)	R_s (naf/tol)	A_s (naf)	k (naf)	t_R (naf)
I (média)	23.450 $\pm$ 1.770	2,18 $\pm$ 0,03	1,29 $\pm$ 0,03	2,39 $\pm$ 0,04	27,6 $\pm$ 0,3
1	1.750 $\pm$ 3.540	-0,40 $\pm$ 0,05*	-0,18 $\pm$ 0,05*	-0,48 $\pm$ 0,07*	-4,5 $\pm$ 0,6*
2	-1.050 $\pm$ 3.540	-1,00 $\pm$ 0,05*	0,08 $\pm$ 0,05	-1,58 $\pm$ 0,07*	-12,2 $\pm$ 0,6*
12	700 $\pm$ 3.540	0,05 $\pm$ 0,05	0,03 $\pm$ 0,05	0,08 $\pm$ 0,07	1,1 $\pm$ 0,6
3	-1.600 $\pm$ 3.540	-0,15 $\pm$ 0,05*	0,18 $\pm$ 0,05*	-0,18 $\pm$ 0,07*	-19,6 $\pm$ 0,6*
13	-450 $\pm$ 3.540	0	-0,08 $\pm$ 0,05	-0,03 $\pm$ 0,07	1,4 $\pm$ 0,6
23	-1.250 $\pm$ 3.540	0	0,08 $\pm$ 0,05	-0,03 $\pm$ 0,07	4,9 $\pm$ 0,6*
123	-1.200 $\pm$ 3.540	-0,05 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,05*	0,03 $\pm$ 0,07	-0,1 $\pm$ 0,6

(*) efeitos mais significativos.

As figuras 17 a 21 apresentam a distribuição normal das estimativas dos efeitos encontradas na tabela 15. Os efeitos mais significativos são aqueles que se encontram fora da reta e são observados também na tabela 15, considerando também os erros dos efeitos aplicados ao teste t ($t_{7;95\%} = 2,365$), equação 18.

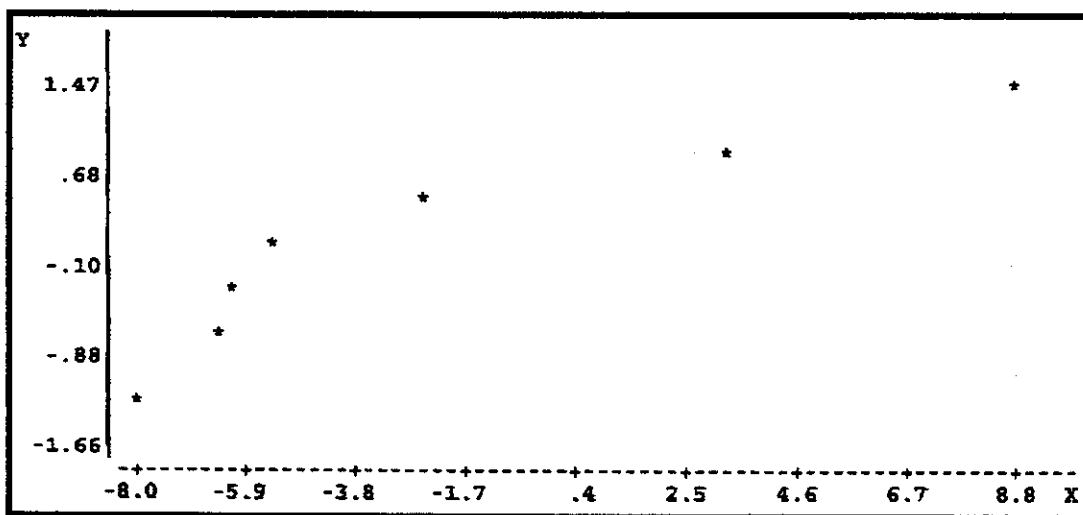


Figura 17 - Distribuição normal dos efeitos para eficiência (N/m) - C18.

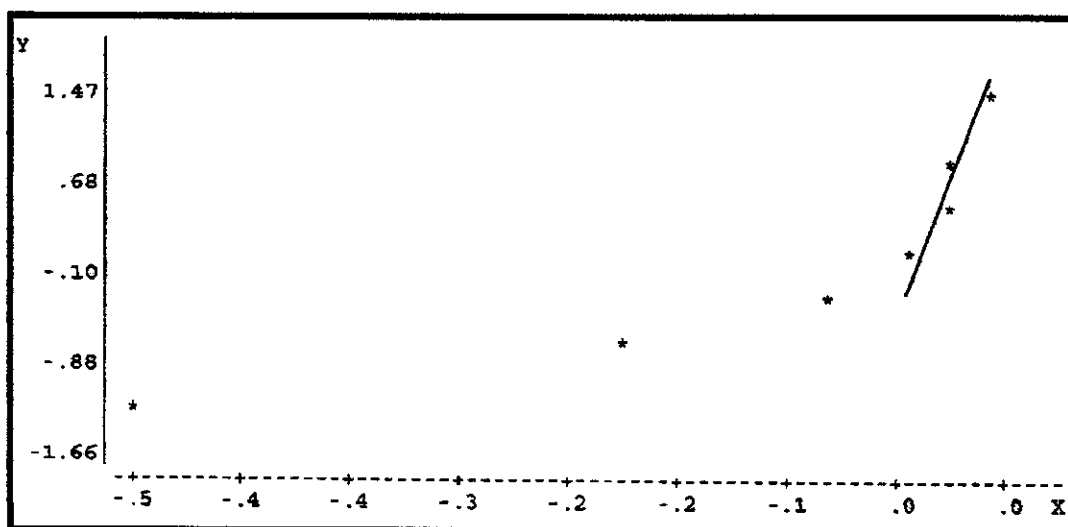


Figura 18 - Distribuição normal dos efeitos para resolução (R_s) - C18.

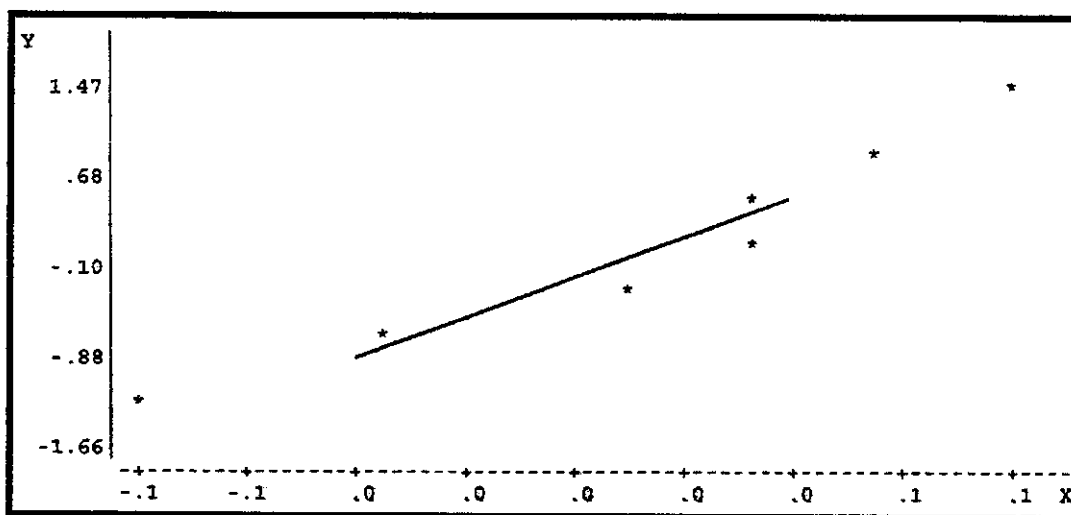


Figura 19 - Distribuição normal dos efeitos para o fator de assimetria (A_s) - C18.

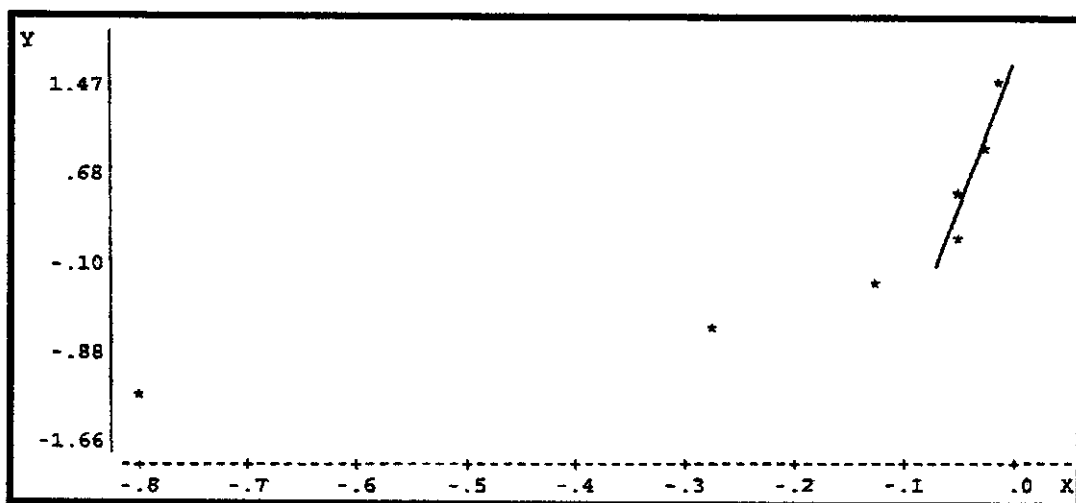


Figura 20 - Distribuição normal dos efeitos para o fator de retenção (k) - C18.

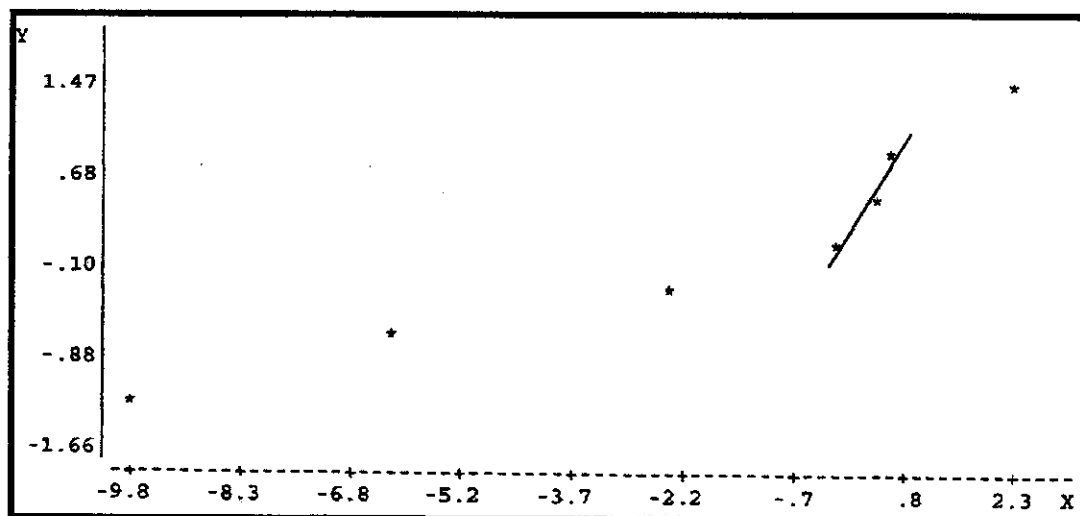


Figura 21 - Distribuição normal dos efeitos para o tempo de retenção (t_R) - C18.

Os resultados de eficiência (N/m) não foram significativamente diferentes entre cada combinação dos níveis e fatores. Assim, pode-se apenas considerar uma média entre esses valores obtidos. Apesar do gráfico de distribuição normal das estimativas dos efeitos mostrar três possíveis efeitos significativos (pontos mais deslocados dos demais) (figura 17), o teste t mostra que nenhum deles é estatisticamente significativo. A figura 22 apresenta os resultados da tabela 14 na forma de diagrama.

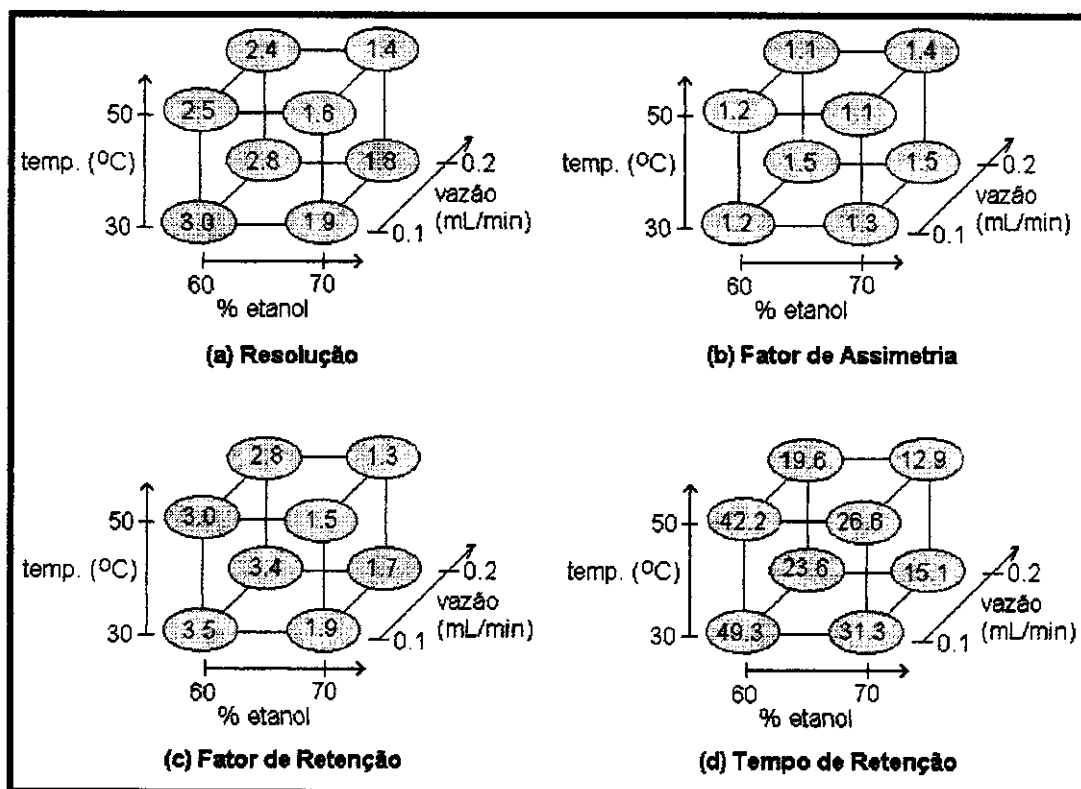


Figura 22 - Resultados do fatorial 2^3 - coluna C18-1

Através dos resultados das tabelas 14 e 15 e figura 22, pode-se perceber a variação das respostas (resolução, fator de assimetria, fator de retenção e tempo de análise) em função da mudança dos níveis. De um modo geral, todas as respostas (parâmetros cromatográficos) diminuem com o aumento de temperatura de nível baixo para nível alto (30 para 50 °C), tendo sido o principal efeito sobre as respostas avaliadas.

A resolução obtida com o ensaio 8 (tabela 14) foi de 1,4, único resultado ligeiramente abaixo do recomendado pela literatura [4] para este parâmetro cromatográfico.

O fator de assimetria teve melhores resultados a temperatura de 50 °C, na qual a viscosidade da fase móvel também é menor. A vazão da fase móvel em nível alto (0,2 mL min⁻¹), no entanto, contribui para o aumento da assimetria, principalmente na temperatura de 30 °C (figura 22b). Mesmo assim, em todos os ensaios o fator de assimetria ficou dentro do recomendado [4] para uma análise quantitativa.

Os melhores resultados para o fator de retenção encontram-se na concentração de etanol a 60%, sendo que diminuem com o aumento da temperatura e muito pouco com a vazão, mesmo tendo sido considerado um efeito significativo (figura 22c). Sobre o tempo de análise, a vazão, como esperado, foi o efeito mais significativo.

A figura 23 mostra os cromatogramas obtidos com os ensaios 1 e 6 (tabela 14), respectivamente. Com o ensaio 1 obteve-se bons resultados mas o tempo de análise mostrou ser bastante longo (cerca de 49 minutos). Já no ensaio 6, as respostas (parâmetros cromatográfico) foram bem otimizados e com o tempo de análise mais reduzido (cerca de 20 minutos).

Um novo fatorial (2²) foi necessário para procurar reduzir o tempo de separação da mistura padrão porém, trabalhando-se em uma temperatura mais baixa. A vazão da fase móvel foi mantida constante (0,15 mL min⁻¹), tendo como fatores apenas a temperatura (fator 1) e a concentração de etanol (fator 2). Os resultados do fatorial 2² são apresentados na tabela 16. Os níveis dos fatores são encontrados na tabela 11.

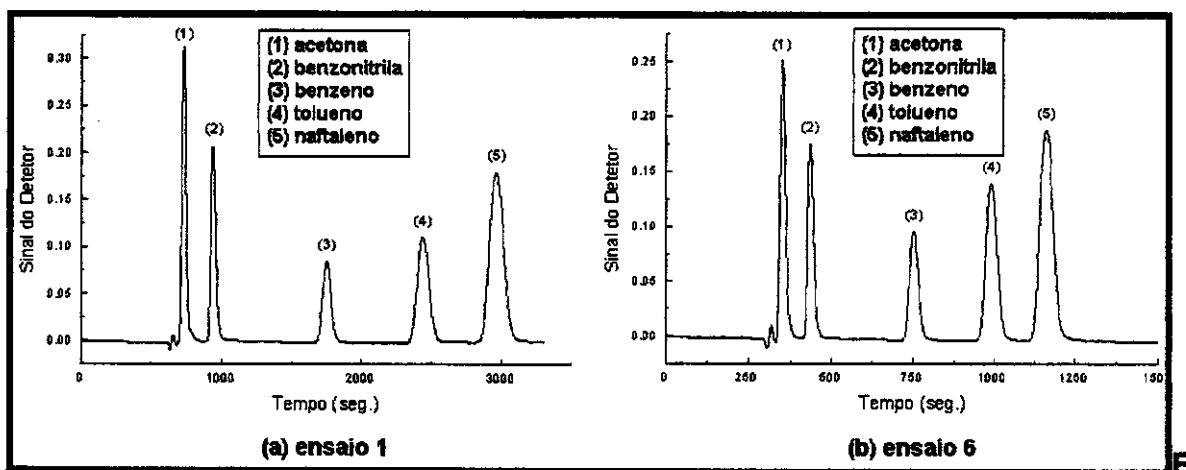


figura 23 - Cromatogramas obtidos com a coluna C18-1 pelo planejamento fatorial 2^3 . (a) temperatura 30 °C, EtOH:H₂O 60:40 (v/v), vazão 0,1 mL min⁻¹. (b) temperatura 50 °C, EtOH:H₂O 60:40 (v/v), vazão 0,2 mL min⁻¹.

Tabela 16 - Resultados do planejamento fatorial 2^2 (coluna C18-1).

Ensaio	Combinação*		N/m	R _s	A _s	k	t _R (naf)
	(1)	(2)	(naf)	(naf/tol)	(naf)	(naf)	min
9	-	-	22.000 ± 450	2,9 ± 0,0	1,3 ± 0,1	3,6 ± 0,0	33,0 ± 0,0
10	+	-	22.900 ± 90	2,7 ± 0,1	1,2 ± 0,0	3,2 ± 0,0	29,5 ± 0,1
11	-	+	21.800 ± 30	2,1 ± 0,0	1,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	23,3 ± 0,3
12	+	+	23.300 ± 0	2,0 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,0 ± 0,0	21,6 ± 0,0

(*) ver tabela 11. naf = naftaleno; tol = tolueno.

Os tempos de análise obtido nos ensaios 11 e 12 estão próximos ao obtido com o ensaio 6 do fatorial 2^3 (tabela 14), porém trabalhando-se numa temperatura menor (40 °C). A resolução dos picos, fator de assimetria e fator de retenção estão dentro do esperado para uma separação cromatográfica. Os cromatogramas dos ensaios 11 e 12 (tabela 16) estão na figura 24. Novamente, a eficiência (N/m) não foi significativamente diferente dentro dos ensaios realizados.

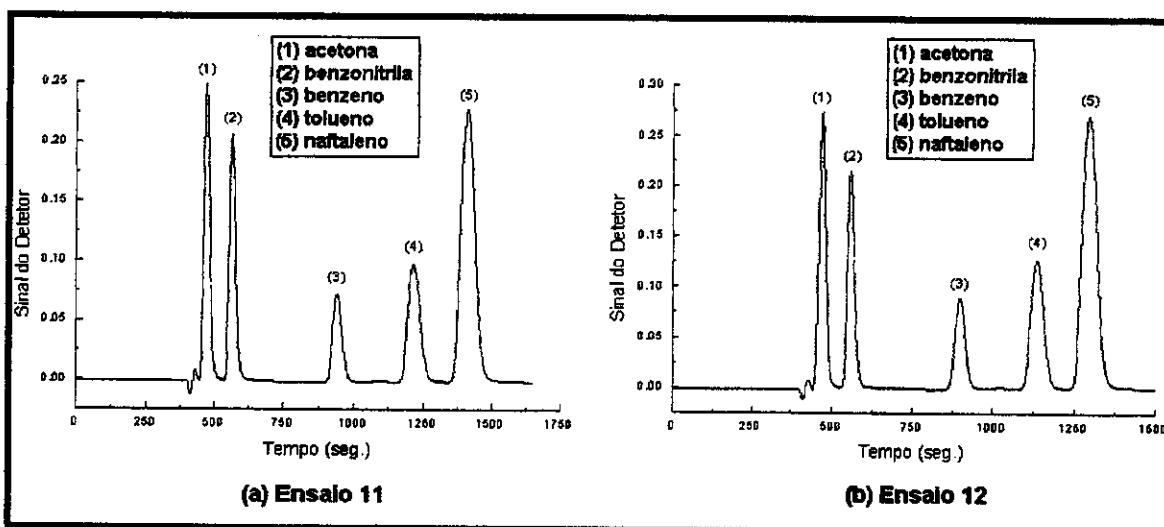


Figura 24 - Cromatogramas obtidos com a coluna C18-1 pelo planejamento fatorial 2². (a) temperatura 30 °C, EtOH:H₂O 65:35 (v/v), vazão 0,15 mL min⁻¹. (b) temperatura 40 °C, EtOH:H₂O 65:35 (v/v), vazão 0,15 mL min⁻¹.

4.3 - Resultados do planejamento fatorial obtidos com a coluna C8:

Os resultados do planejamento fatorial 2³ obtidos com coluna recheada com a fase estacionária comercial C8 são dados na tabela 17. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os níveis e fatores são dados na tabela 10. Para este procedimento foi utilizada a coluna 3 (tabela 9).

Tabela 17 - Resultados obtidos com o planejamento fatorial 2^3 (coluna C8-3).

Ensaio	Combinação*			N/m	R_s	A_s	k	t_R
	(1)	(2)	(3)	(naf)	(naf/tol)	(naf)	(naf)	(naf)/min
13	-	-	-	39.000 ± 200	$2,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,0$	$2,9 \pm 0,1$	$43,9 \pm 0,7$
14	+	-	-	34.500 ± 2.100	$1,8 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,0$	$2,2 \pm 0,0$	$35,6 \pm 0,4$
15	-	+	-	38.500 ± 70	$1,9 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,0$	$30,4 \pm 0,2$
16	+	+	-	32.400 ± 7.700	$1,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,0$	$36,5 \pm 0,0$
17	-	-	+	34.000 ± 4.670	$2,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,0$	$23,0 \pm 0,1$
18	+	-	+	32.000 ± 60	$1,8 \pm 0,0$	$1,3 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,0$	$18,3 \pm 0,1$
19	-	+	+	31.000 ± 3400	$1,6 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,0$	$17,5 \pm 0,0$
20	+	+	+	28.000 ± 2.700	$1,3 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,0$	$1,7 \pm 0,0$	$14,6 \pm 0,0$

(*) ver tabela 10. naf = naftaleno; tol = tolueno.

A estimativa e o erro dos efeitos estão na tabela 18.

Tabela 18 – Estimativas dos efeitos (da tabela 17).

Efeito	N/m (naf)	R_s (naf/tol)	A_s (naf)	k (naf)	t_R (naf)
I (média)	33.650 ± 1.050	$1,83 \pm 0,03$	$1,28 \pm 0,02$	2,28	$27,48 \pm 0,07$
1	-3.850 ± 2.100	$-0,50 \pm 0,05^*$	$-0,10 \pm 0,04$	$-0,60 \pm 0,01^*$	$-5,50 \pm 0,14^*$
2	-2.450 ± 2.100	$-0,55 \pm 0,05^*$	0	$-0,70 \pm 0,01^*$	$-5,45 \pm 0,14^*$
12	-500 ± 2.100	$0,10 \pm 0,05$	$-0,05 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,01^*$	$1,02 \pm 0,14$
3	-4.950 ± 2.100	$-0,10 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,01$	$-18,26 \pm 0,14^*$
13	1.500 ± 2.100	$0,05 \pm 0,05$	$-0,05 \pm 0,04$	0	$1,71 \pm 0,14$
23	-1.100 ± 2.100	$-0,10 \pm 0,05$	$-0,05 \pm 0,04$	$-0,10 \pm 0,01$	$0,89 \pm 0,14$
123	250 ± 2.100	$0,05 \pm 0,05$	0	$0,05 \pm 0,01$	$-0,12 \pm 0,14$

(*) efeitos mais significativos.

As figuras 25 a 29 apresentam a distribuição normal das estimativas dos efeitos encontradas na tabela 18. Os efeitos mais significativos são aqueles que se encontram fora da reta e são observados também na tabela 18, considerando também os erros dos efeitos aplicados ao teste t ($t_{7,95\%} = 2,365$), equação 18. A figura 30 mostra os resultados da tabela 17 na forma de diagrama.

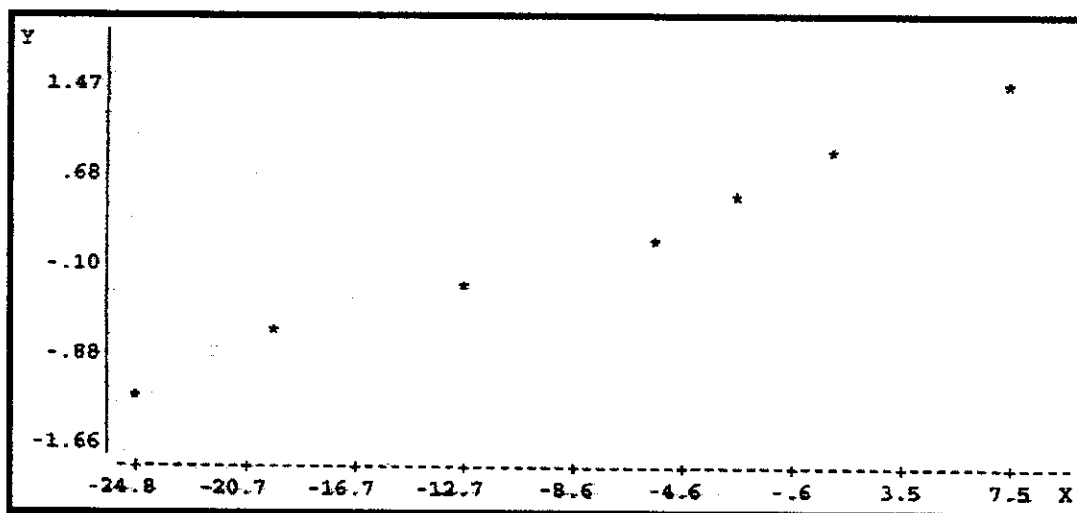


Figura 25 - Distribuição normal dos efeitos para eficiência (N/m) - C8.

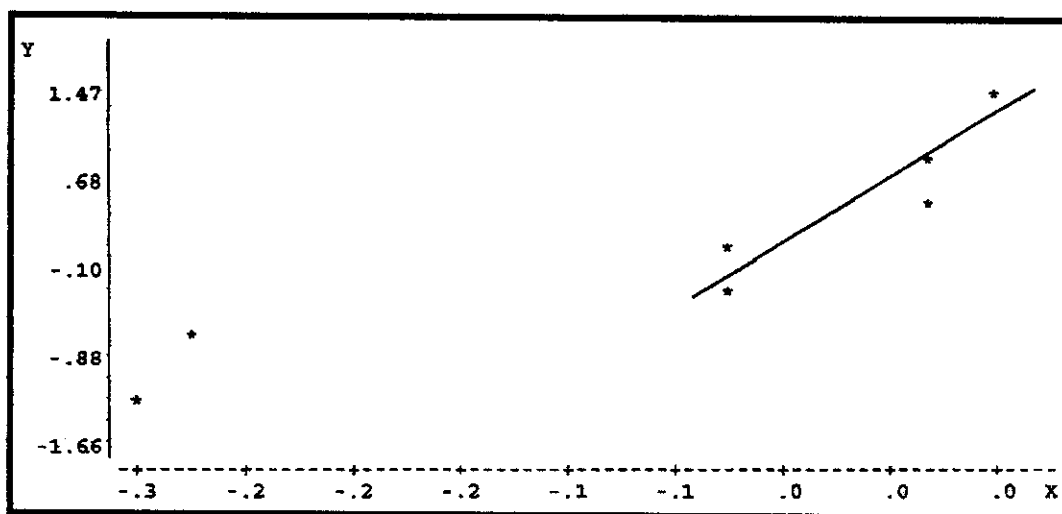


Figura 26 - Distribuição normal dos efeitos para resolução (R_s) - C8.

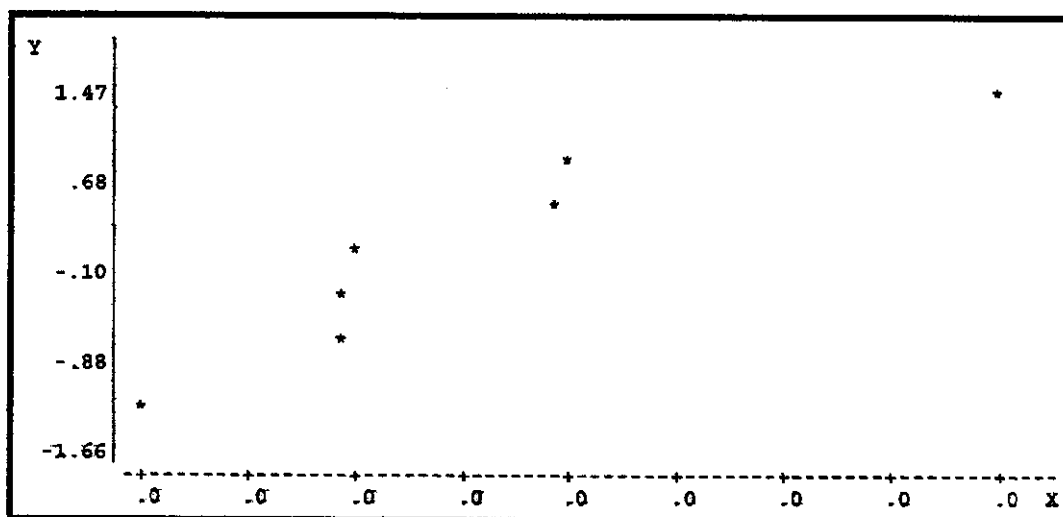


Figura 27 - Distribuição normal dos efeitos para o fator de assimetria (A_s) - C8.

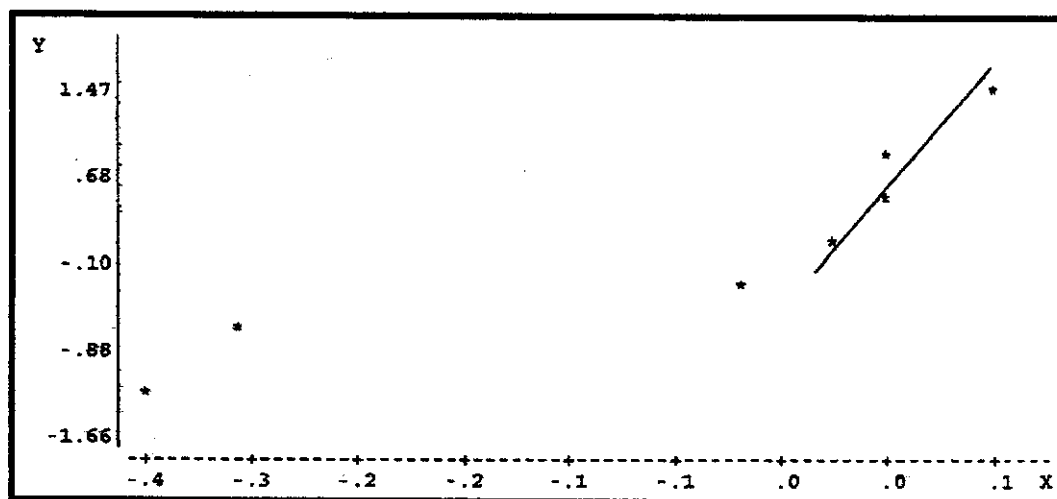


Figura 28 - Distribuição normal dos efeitos para o fator de retenção (k) - C8.

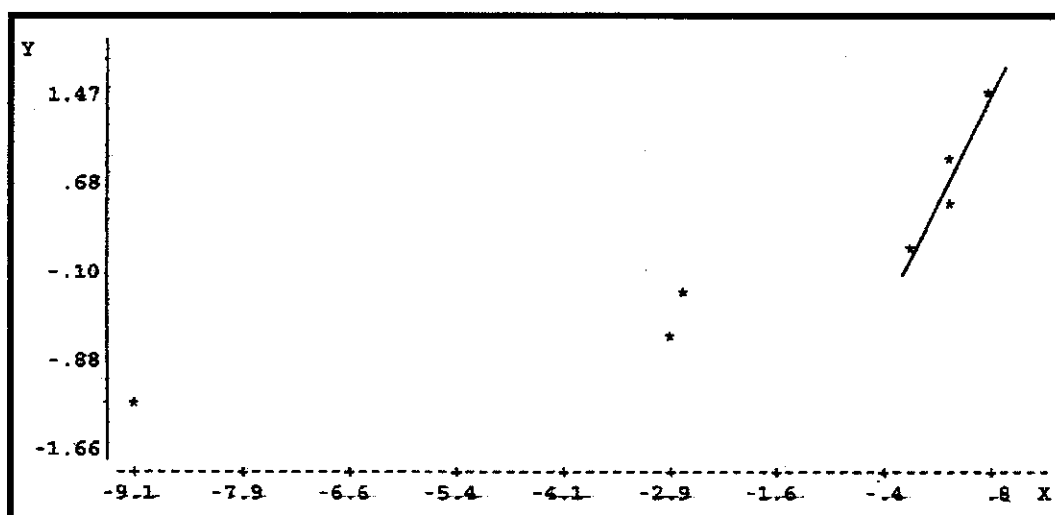


Figura 29 - Distribuição normal dos efeitos para o tempo de retenção (t_R) - C8.

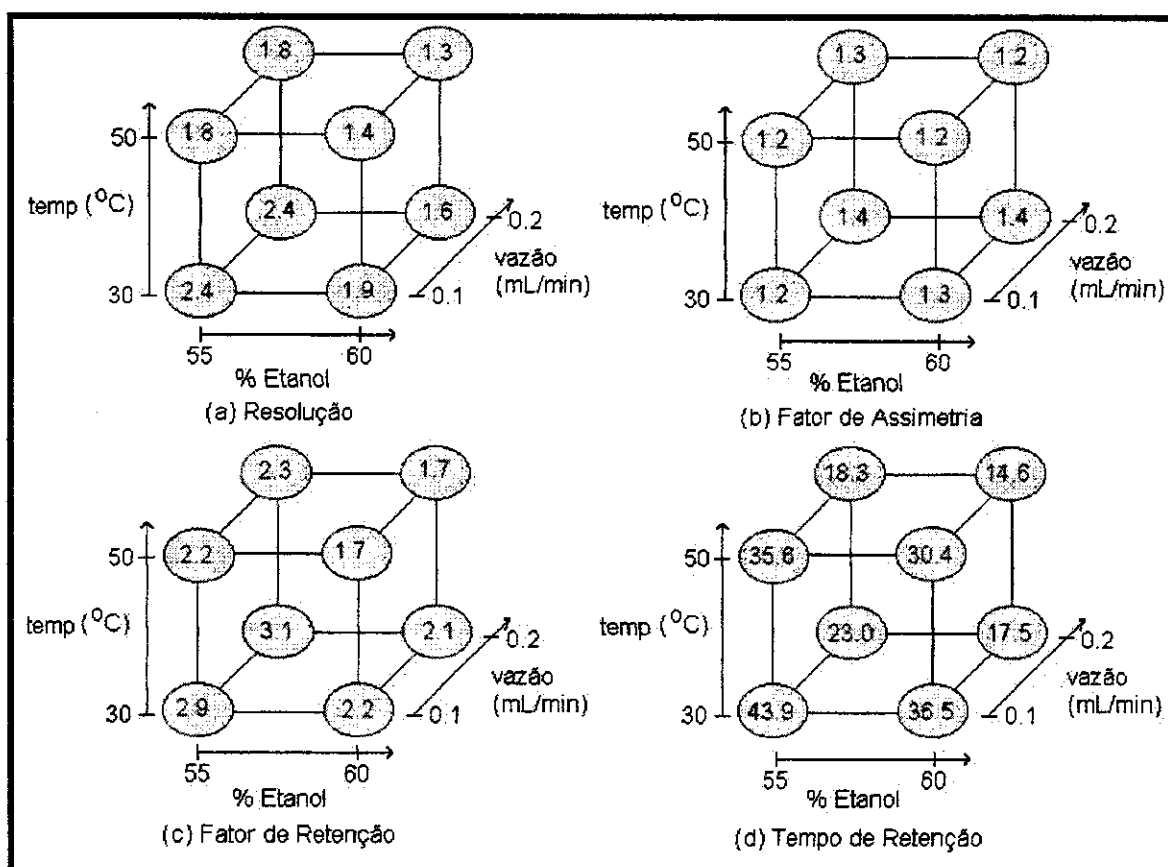


Figura 30 - Resultados do fatorial 2^3 - coluna C8-3.

Os resultados de eficiência (N/m) com a coluna C8, como para a coluna C18, não foram significativamente diferentes entre cada combinação dos níveis e fatores. Assim, pode-se apenas considerar uma média entre esses valores obtidos.

De maneira semelhante aos ensaios realizados com a coluna C18, a resolução, fator de retenção e tempo de análise diminuem com o aumento da temperatura (efeito principal 1).

A resolução dos picos (naftaleno/tolueno) ficou em valores razoáveis, de 1,6 a 2,4, com exceção dos ensaios 16 e 20 (tabela 17), onde a temperatura (efeito principal 1) e porcentagem de etanol (efeito principal 2), estão em nível alto (+).

O fator de assimetria praticamente não variou com os ensaios realizados. De acordo com a tabela 18, os efeitos foram muito pequenos, sugerindo que a mudança dos níveis, propostos para este fatorial 2^3 , não foram significativos para variar este parâmetro cromatográfico. Mesmo assim, bons valores de simetria foram obtidos, variando de 1,2 a 1,4.

Os melhores resultados para o fator de retenção ocorreram com a concentração de etanol a 55%, sendo que diminuem principalmente com os efeitos principais de temperatura (1) e porcentagem do etanol (2). Os cromatogramas dos ensaios 18 e 20 estão na figura 31.

O menor tempo de análise obtido foi com o ensaio 20 (figura 31b), mas a resolução dos picos não se completou até a linha de base ($R_s = 1,3$). Já no ensaio 18 (figura 31a), os resultados de resolução, retenção e assimetria foram satisfatórios e com um tempo de análise relativamente curto (cerca de 18 minutos), podendo-se considerar uma boa condição para a separação da mistura teste.

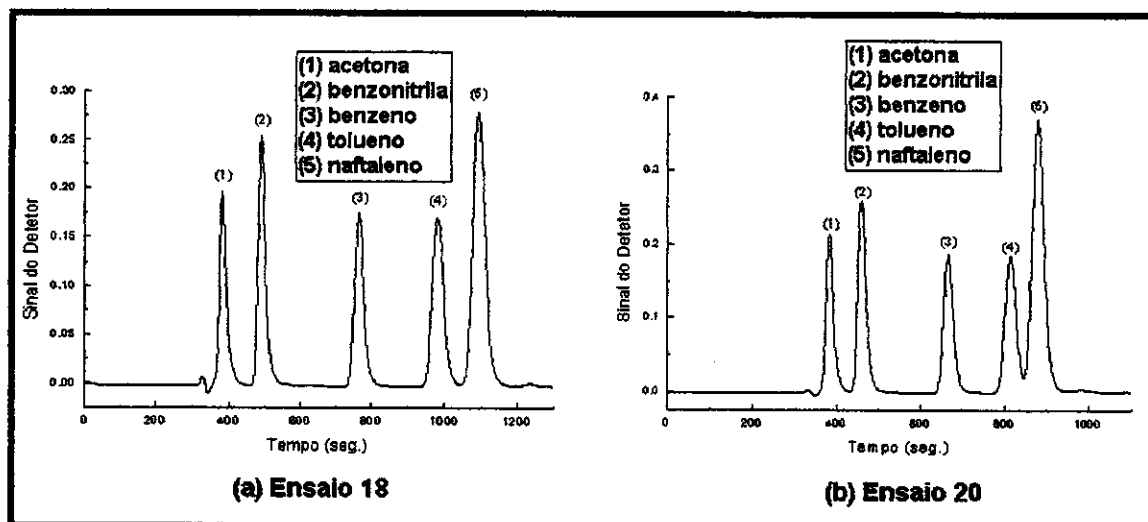


Figura 31 - Cromatogramas obtidos com a coluna C8-3 pelo planejamento fatorial 2³. (a) temperatura 50 °C, EtOH:H₂O 55:45 (v/v), vazão 0,20 mL min⁻¹. (b) temperatura 50 °C, EtOH:H₂O 60:40 (v/v), vazão 0,20 mL min⁻¹.

Os resultados do fatorial 2² são dados na tabela 19. A vazão foi mantida constante (0,20 mL min⁻¹) para este fatorial. Os níveis e fatores do novo fatorial são vistos na tabela 10.

Tabela 19 - Resultados do planejamento fatorial 2² (coluna C8-3).

Ensaio	Combinação*		N/m (naf)	R _s (naf/tol)	A _s (naf)	k (naf)	t _R (naf) min
	(1)	(2)					
21	-	-	27.500 ± 1.500	2,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1	4,2 ± 0,0	28,3 ± 0,3
22	+	-	26.800 ± 1.890	2,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	3,5 ± 0,0	24,3 ± 0,0
23	-	+	28.400 ± 5.340	1,9 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,7 ± 0,0	20,2 ± 0,1
24	+	+	31.900 ± 60	1,8 ± 0,0	1,3 ± 0,1	2,3 ± 0,0	18,3 ± 0,0

(*) ver tabela 10. naf = naftaleno; tol = tolueno.

O melhor conjunto de resultados obtidos foi com o ensaio 24 (tabela 19), que é o mesmo ensaio 18 do fatorial 2^3 (tabela 17, cromatograma da figura 31a). Com o novo fatorial, em média, obteve-se menores tempos de análise (de 28 a 18 minutos), mantendo-se bons resultados para os outros parâmetros cromatográficos.

4.4 - Otimização da vazão da fase móvel pela curva de van Deemter:

Através da construção das curvas de van Deemter, obteve-se a eficiência máxima das colunas de separação utilizando as três diferentes fases móveis: etanol:água (EtOH:H₂O), metanol:água (MeOH:H₂O) e acetonitrila:água (ACN:H₂O). A tabela 20 apresenta a vazão ótima obtida para cada fase móvel com a coluna C18 e a tabela 21 para a coluna C8. A composição de cada fase móvel é dada na tabela 12. Para este procedimento foram utilizadas as colunas 1 (C18) e 4 (C8) (tabela 9).

As curvas de van Deemter para cada fase móvel são apresentadas nas figuras 32, para a coluna C18, e 33, para a coluna C8.

Tabela 20 - Vazão das fases móveis otimizadas pela curva de van Deemter (coluna C18-1).

FASE MÓVEL	F (mL min ⁻¹)	N/m (naf)
EtOH:H ₂ O 25 °C	0,15	32.100
EtOH:H ₂ O 40 °C	0,25	29.500
MeOH:H ₂ O	0,35	32.300
ACN:H ₂ O	0,30	27.300

Tabela 21- Vazão das fases móveis otimizadas pela curva de van Deemter (coluna C8-4).

FASE MÓVEL	F (mL min ⁻¹)	N/m (naf)
EtOH:H ₂ O 25 °C	0,20	36.000
EtOH:H ₂ O 40 °C	0,20	32.300
MeOH:H ₂ O	0,35	35.700
ACN:H ₂ O	0,30	30.700

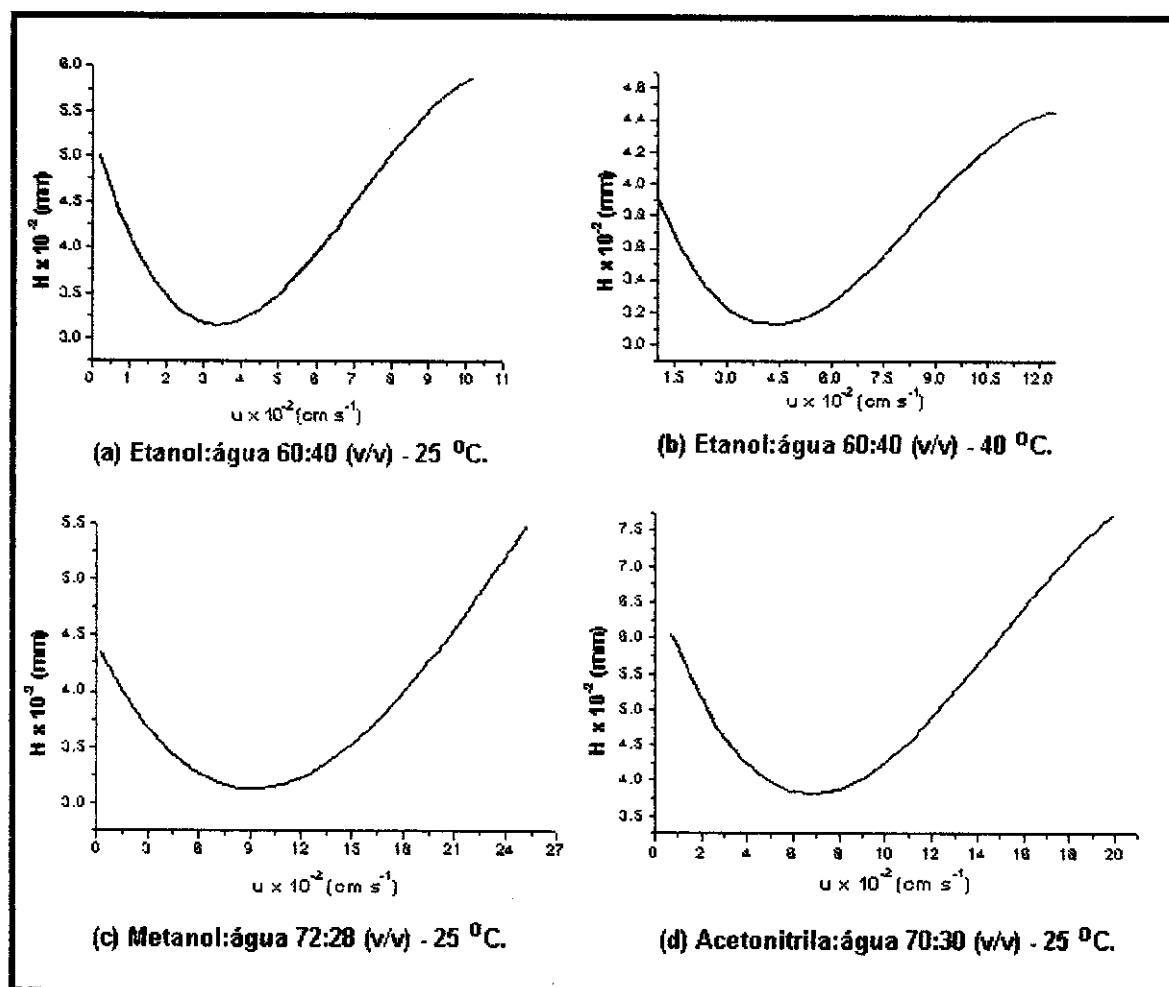


Figura 32 - Curvas de van Deemter - coluna C18.

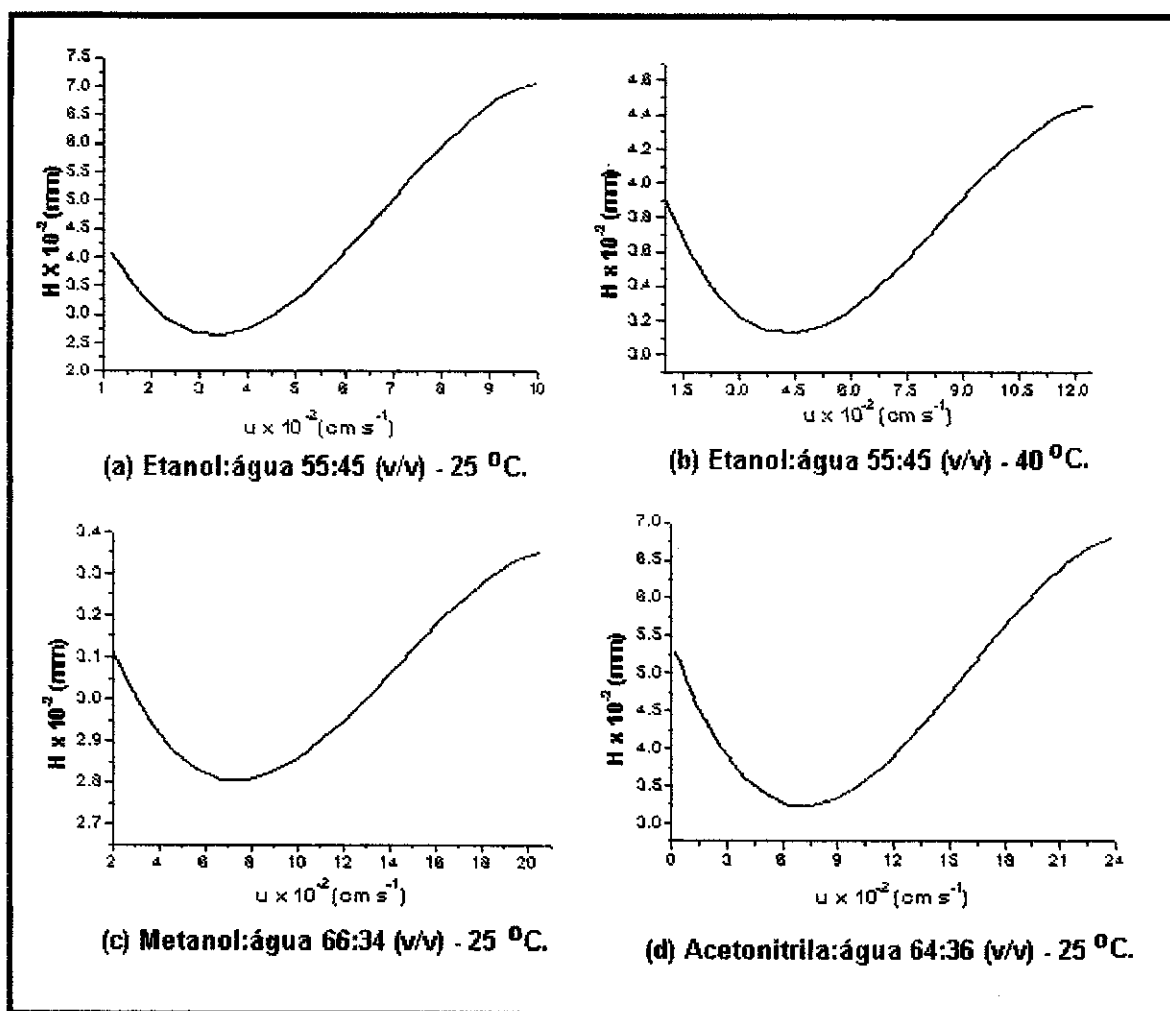


Figura 33 - Curvas de van Deemter - coluna C8.

Os parâmetros cromatográficos calculados a partir de cada separação otimizada pela curva de van Deemter são apresentados na figura 34, para a coluna C18 e figura 35, para a coluna C8.

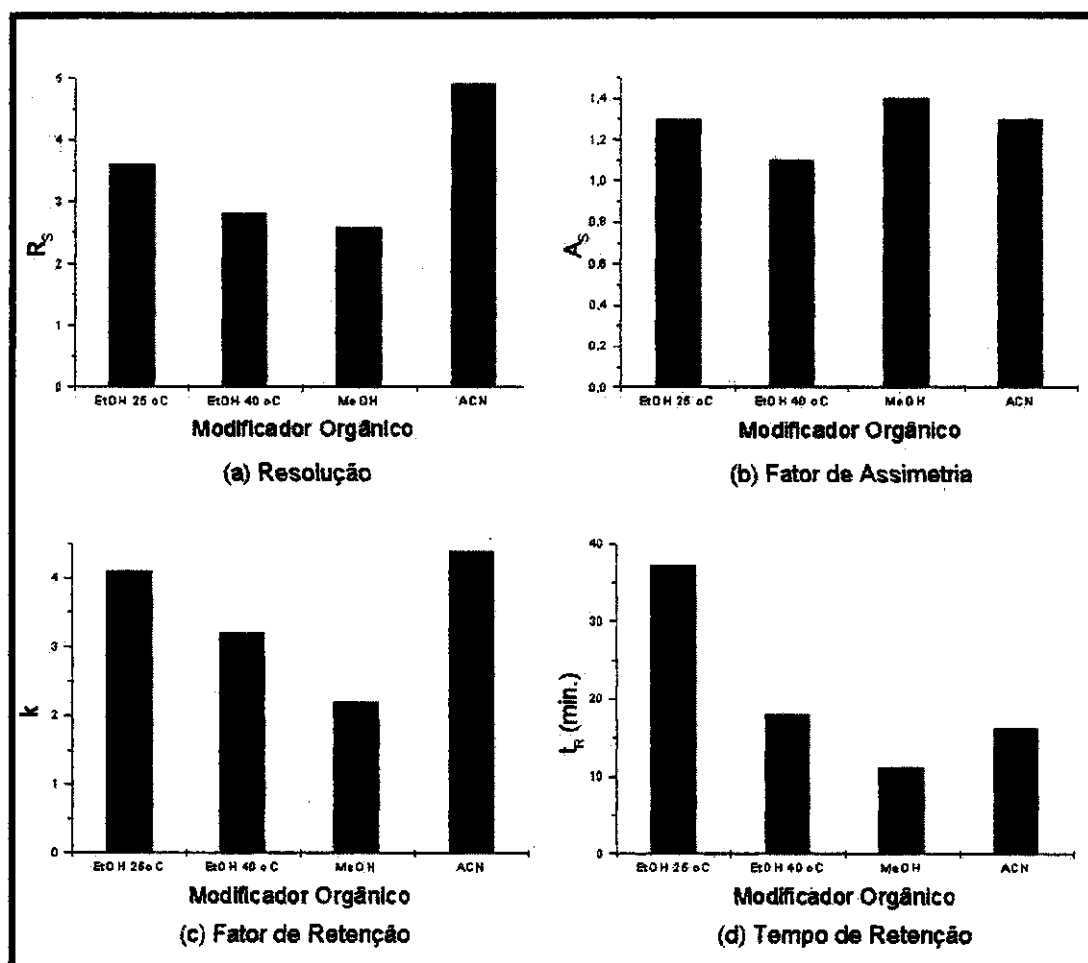


Figura 34 - Parâmetros Cromatográficos obtidos com cada modificador orgânico - coluna C18-1.

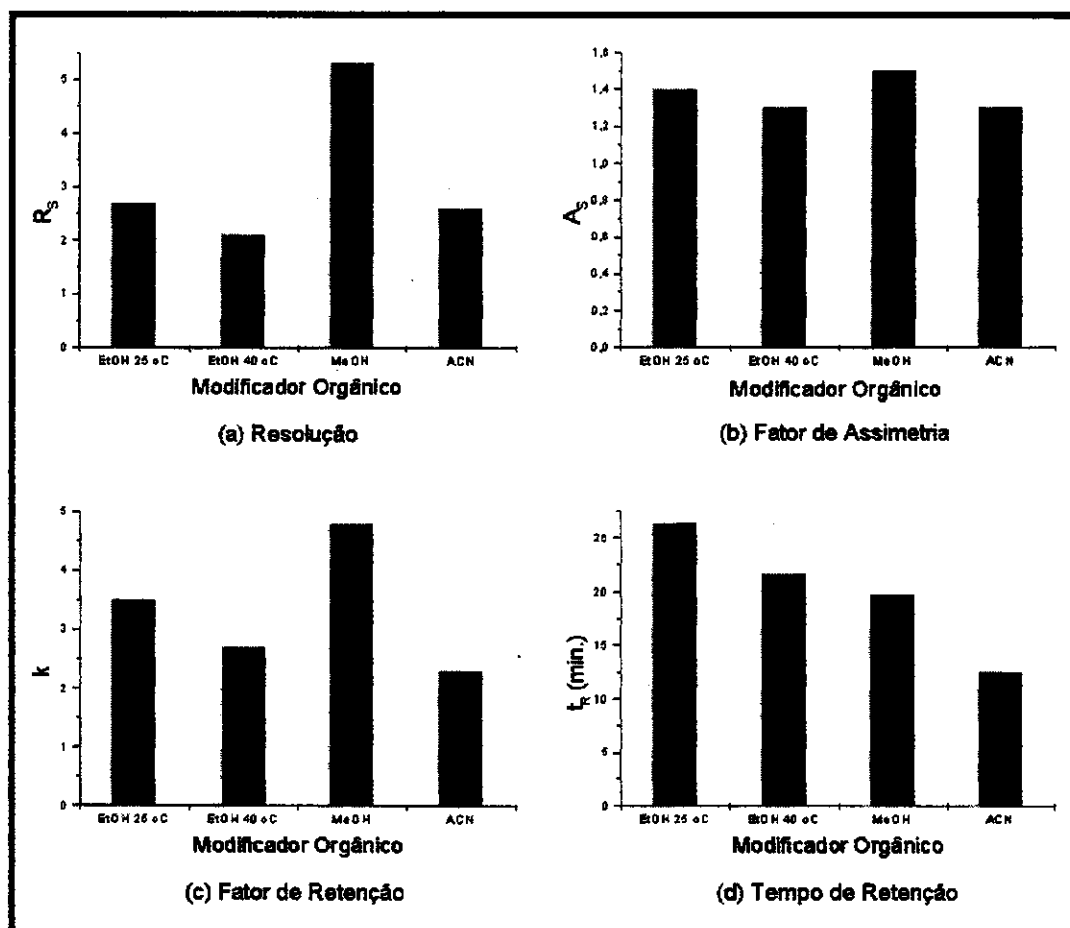


Figura 35- Parâmetros Cromatográficos obtidos com cada modificador orgânico - coluna C8-4.

Analisando os resultados apresentados para os três diferentes modificadores orgânicos, os maiores valores de resolução foram obtidos com metanol:água, utilizando a coluna C8, e acetonitrila:água com a coluna de fase C18. Etanol:água apresentou menores valores de resolução para a separação, mas todas dentro de uma faixa considerada normal pela literatura, para ambas as colunas. O fator de assimetria teve o menor valor com etanol:água a 40 °C utilizando a coluna C18. Mesmo a 25 °C, etanol:água resultou em picos de assimetria equivalentes às outras fases móveis utilizadas, para ambas as colunas. Como a viscosidade da fase móvel etanol:água é maior, esperava-se que o fator de assimetria também fosse maior do que o obtido para as outras

fases móveis. Com a fase móvel acetonitrila:água, o fator de assimetria foi o mesmo para as duas colunas. Da mesma forma para o fator de retenção, todos os resultados ficaram dentro de uma faixa ideal.

Mesmo tendo a mesma força cromatográfica, a seletividade de cada fase móvel testada é diferente, o que varia muito o resultado para este parâmetro cromatográfico. Deve-se considerar ainda que cada uma dessas fases móveis apresentam uma viscosidade diferente, em função da porcentagem do modificador orgânico, afetando diretamente na transferência de massa do soluto entre as duas fases, móvel e estacionária.

Um requisito importante durante uma separação cromatográfica é que esta seja feita no menor tempo possível e com todos os picos separados. Esta avaliação é feita pelo pico mais retido, neste caso, o naftaleno. Dentro do que se propõe a curva de van Deemter, ou seja, obter a vazão da fase móvel que resulte na eficiência máxima da coluna, acetonitrila:água foi a fase móvel que separou a mistura em menor tempo, em cerca de 16 minutos com a coluna C18 e 12 minutos com a coluna C8, enquanto metanol:água, em tempo ainda menor, separou todos os picos em cerca de 11 minutos com a coluna C18. Mesmo em temperatura ambiente, acetonitrila:água e metanol:água têm menores viscosidades, permitindo uma transferência de massa dos solutos da mistura muito mais rápida entre a fase móvel e estacionária. Isso reduz o tempo total para que a mistura seja completamente separada dentro do sistema cromatográfico. Mesmo considerando sua alta viscosidade, etanol:água separou todos os picos num tempo de cerca de 18 minutos com a coluna C18 e 21 minutos com a coluna C8, na temperatura de 40 °C (figuras 34d e 35d). Considerando que a vazão ótima de trabalho da fase móvel etanol:água foi menor do que as outras fases móveis (tabelas 20 e 21), para ambas as colunas e temperaturas, o tempo total de separação da mistura padrão utilizada pode ser considerado curto.

4.5 - Efeito da temperatura sobre a separação:

Os resultados do efeito da temperatura sobre a separação cromatográfica utilizando etanol:água com fase móvel (FM) são dados na tabela 22, para a coluna de fase estacionária C18 e tabela 23, para a coluna de fase C8. O efeito da temperatura que acompanha a separação cromatográfica também foi verificada para o sistema metanol:água e acetonitrila:água (tabelas 24 a 27). Os resultados também podem ser acompanhados pelas figuras 36 (coluna C18) e 37 (coluna C8).

Tabela 22 - Efeito da temperatura sobre a separação cromatográfica (coluna C18-1); FM EtOH:H₂O (60:40 v/v); F=0,2mL min⁻¹.

TEMPERATURA (°C)	R _s (naf/tol)	A _s (naf)	k (naf)	t _R (naf) min.
25	2,6	1,6	3,7	24,6
30	2,5	1,5	3,5	23,3
35	2,3	1,5	3,3	21,9
40	2,2	1,4	3,1	20,9
45	2,1	1,3	2,9	19,7
50	2,0	1,3	2,7	18,7
55	2,0	1,2	2,5	17,8
60	1,9	1,1	2,4	16,9

Tabela 23 - Efeito da temperatura sobre a separação cromatográfica (coluna C8-4); FM EtOH:H₂O (55:45 v/v); F=0,2mL min⁻¹.

TEMPERATURA (°C)	R _s (naf/tol)	A _s (naf)	k (naf)	t _R (naf) min.
25	2,4	1,5	3,4	24,4
30	2,3	1,4	3,1	23,0
35	2,3	1,5	2,9	21,5
40	1,9	1,4	2,7	20,2
45	1,9	1,4	2,5	19,1
50	1,8	1,3	2,3	18,3
55	1,7	1,4	2,1	17,0
60	1,5	1,4	2,0	16,2

Tabela 24 - Efeito da temperatura sobre a separação cromatográfica (coluna C18-1); FM MeOH:H₂O (72:28 v/v); F=0,2mL min⁻¹.

TEMPERATURA (°C)	R _s (naf/tol)	A _s (naf)	k (naf)	t _R (naf) min.
25	4,0	1,3	4,3	28,1
30	3,9	1,2	4,1	26,5
35	3,8	1,2	3,9	25,1
40	3,7	1,2	3,6	23,7
45	3,5	1,1	3,4	22,5
50	3,4	1,2	3,2	21,4
55	3,2	1,1	2,9	19,8
60	3,0	1,1	2,7	18,7

Tabela 25 - Efeito da temperatura sobre a separação cromatográfica (coluna C8-4); FM MeOH:H₂O (66:34 v/v); F=0,2mL min⁻¹.

TEMPERATURA (°C)	R _s (naf/tol)	A _s (naf)	k (naf)	t _R (naf) min.
25	4,4	1,3	3,9	27,9
30	4,2	1,3	3,6	26,2
35	4,0	1,3	3,4	25,0
40	3,8	1,2	3,2	23,6
45	3,6	1,2	3,0	22,2
50	3,4	1,2	2,7	21,0
55	3,2	1,2	2,6	19,8
60	3,0	1,2	2,4	18,8

Tabela 26 - Efeito da temperatura sobre a separação cromatográfica (coluna C18-1); FM ACN:H₂O (70:30 v/v); F=0,2mL min⁻¹.

TEMPERATURA (°C)	R _s (naf/tol)	A _s (naf)	k (naf)	t _R (naf) min.
25	2,3	1,2	2,2	16,7
30	2,3	1,2	2,1	16,2
35	2,2	1,3	2,0	16,1
40	2,1	1,2	1,9	15,6
45	2,0	1,2	1,8	14,5
50	2,0	1,2	1,7	14,0
55	1,8	1,2	1,6	13,5
60	1,7	1,2	1,6	13,1

Tabela 27 - Efeito da temperatura sobre a separação cromatográfica (coluna C8-4); FM ACN:H₂O (64:36 v/v); F=0,2mL min⁻¹.

TEMPERATURA (°C)	R _s (naf/tol)	A _s (naf)	k (naf)	t _R (naf) min.
25	2,6	1,2	2,2	17,7
30	2,5	1,2	2,1	17,0
35	2,4	1,2	1,9	16,4
40	2,3	1,3	1,8	15,9
45	2,1	1,2	1,7	15,3
50	2,0	1,2	1,6	14,8
55	1,9	1,2	1,5	14,2
60	1,7	1,3	1,4	13,6

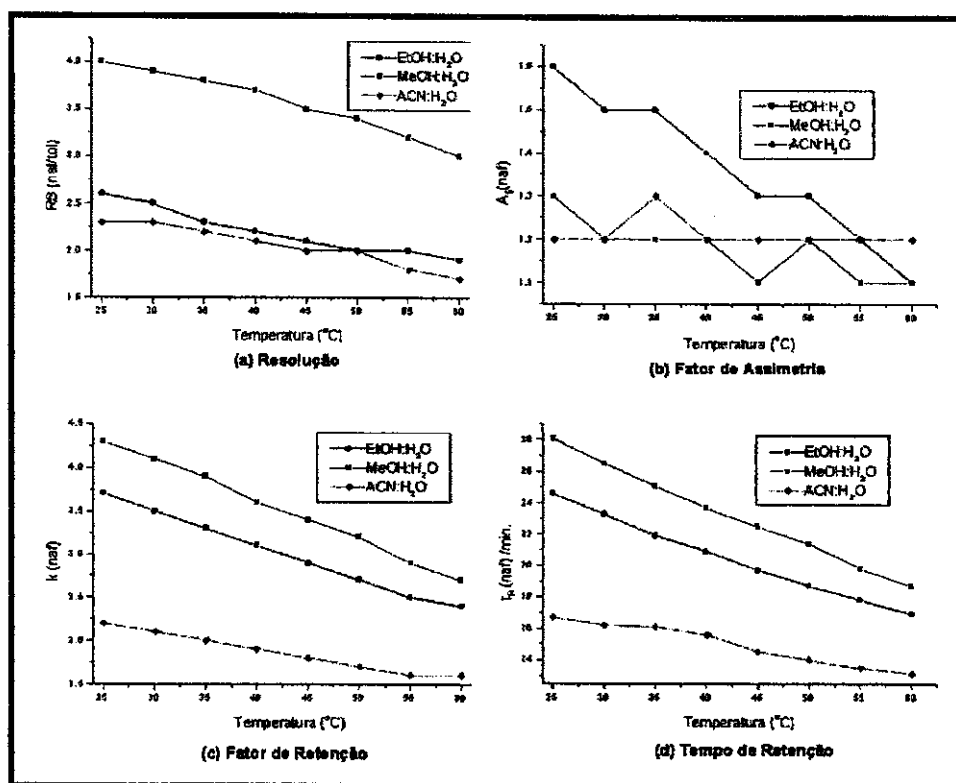


Figura 36 - Parâmetros cromatográficos em função da temperatura - coluna C18-1.

Apesar da diferença apresentada entre as resoluções dos picos para as diferentes fases móveis utilizadas com a coluna C18, o decréscimo na resolução com metanol:água foi mais acentuado (figura 36a, tabela 24). Etanol:água (figura 36a, tabela 22) e acetonitrila:água (figura 36a, tabela 26) variaram menos na resolução com a temperatura de separação. Dentro da faixa de temperatura estudada, 25 a 60 °C, etanol:água apresentou boa resolução entre os picos, mesmo a 60 °C.

O fator de assimetria não apresentou um comportamento regular com a variação de temperatura, a exceção do uso de etanol:água (figura 36b). Para acetonitrila:água (figura 36b) e metanol:água o fator de assimetria pode ser considerado constante dentro da faixa de temperatura estudada, havendo pouca influência da temperatura sobre essas fases móveis.

O fator de retenção e o tempo de análise, respectivamente, demonstram, por sua vez, um decréscimo mais regular com a variação da temperatura, para todas as fases móveis. Segundo a tabela 24, a diferença entre o maior e o menor valor do fator de retenção para metanol:água é de $\Delta k = 1,6$, sugerindo que o aumento da temperatura da separação provoca uma “preferência” do soluto por esta fase móvel mais expressivamente do que para o sistema etanol:água ($\Delta k = 1,3$, tabela 22) e acetonitrila:água ($\Delta k = 0,6$, tabela 26).

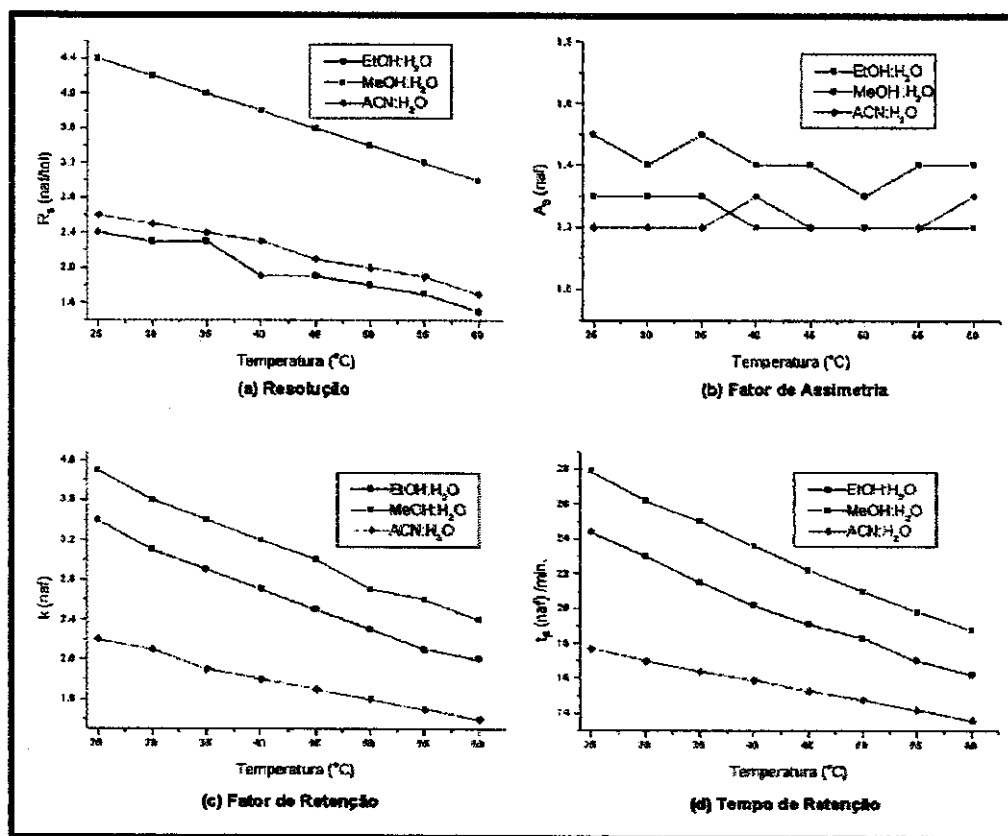


Figura 37 - Parâmetros cromatográficos em função da temperatura - coluna C8-4.

Com relação à coluna C8, a diminuição da resolução utilizando metanol:água (figura 37a, tabela 25) como fase móvel é bastante regular - o aumento em 5 °C reduz a resolução em 0,2 - sendo mais expressiva do que para as fases móveis etanol:água (tabela 23) e acetonitrila:água (tabela 27), semelhante ao ocorrido com a coluna C18.

A variação do fator de assimetria utilizando a coluna C8 foi bastante irregular para o sistema etanol:água (figura 37b), contrário aos resultados obtidos com a coluna C18. Os resultados sugerem mais uma constante deste parâmetro cromatográfico, sendo a variação observada resultado do erro experimental. Metanol:água (figura 37b, tabela 25) e acetonitrila:água (figura 37b, tabela 27) também pouco influenciaram na diminuição do fator de assimetria com a variação da temperatura e, ainda, com resultados pouco diferente com relação a etanol:água.

O fator de retenção e tempo de análise também variaram de uma forma bastante regular para as três fases móveis, utilizando a coluna C8. A variação do fator de retenção do naftaleno com a fase móvel etanol:água (figura 37c, tabela 23) foi bem semelhante à fase móvel metanol:água (figura 37c, tabela 25), $\Delta k = 1,4$ e $1,5$, respectivamente, sugerindo, possivelmente, um efeito de interação deste soluto bem semelhante entre as duas fases móveis. A fase móvel acetonitrila:água (figura 37c, tabela 27) teve menor variação do fator de retenção com o aumento da temperatura, $\Delta k = 0,8$.

Essa pequena variação do fator de retenção do naftaleno com o aumento da temperatura utilizando acetonitrila:água como fase móvel, tanto com a coluna de fase C18 como a de fase C8, pode ser observada na medida em que o valor de k na temperatura de 25°C já é menor do que o apresentado com as outras fases móveis. Etanol:água e metanol:água apresentaram maiores valores de k na menor temperatura estudada (25°C) e resultaram maiores variações de k (Δk) com a temperatura.

4.6 - Resultados do teste de estabilidade das fases estacionárias frente ao uso de etanol:água como fase móvel:

Os resultados do teste de estabilidade realizado com a coluna C18 podem ser vistos nas figuras 38 (C18-2).

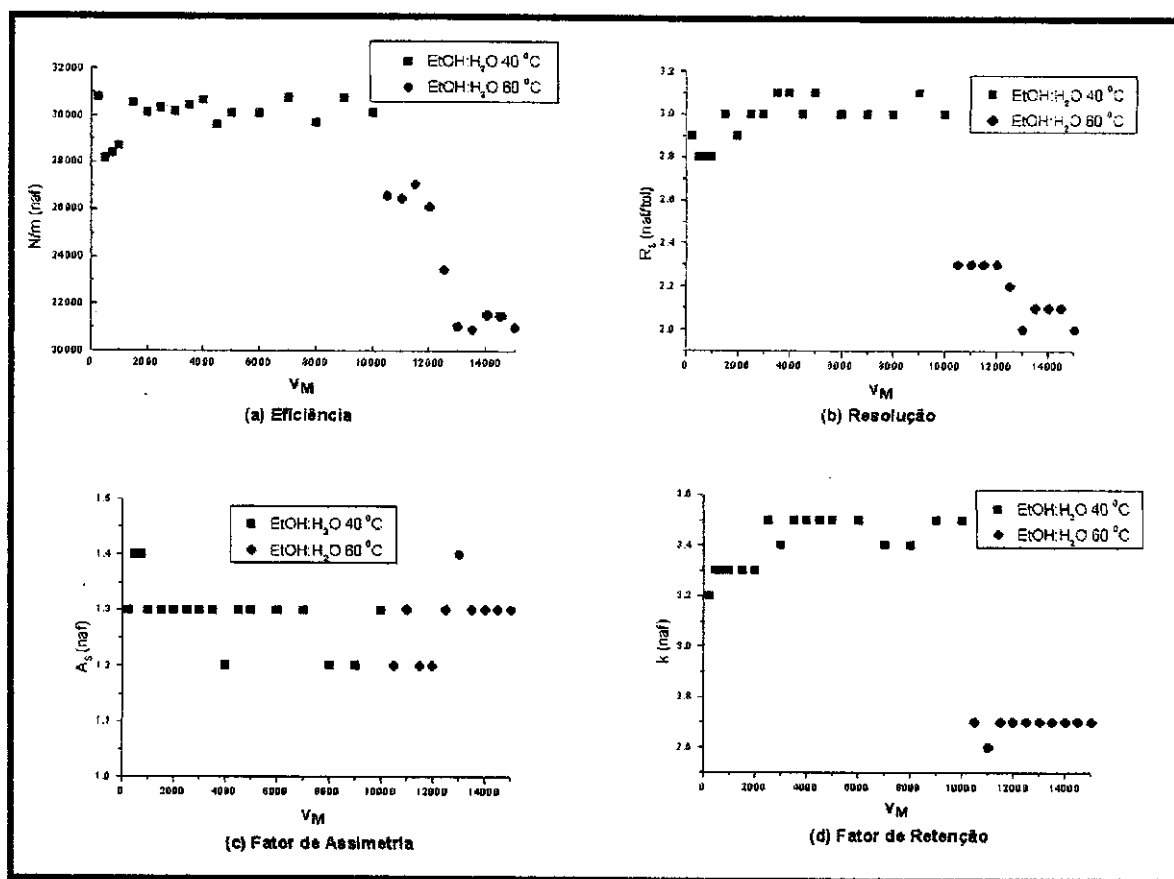


Figura 38 - Resultados do teste de estabilidade usando EtOH:H₂O 60:40 (v/v) como fase móvel - coluna C18-2.

Até 10.000 volumes de fase móvel, a uma temperatura de 40 °C, a eficiência se manteve em torno dos 30.000 pratos/metro com uma queda significativa para cerca de 21.000 pratos/metro, com o aumento da temperatura para 60 °C (figura 36a). No entanto, a assimetria do pico (figura 38c) praticamente não alterou, mantendo-se em torno de 1,3, tanto a 40 como a 60 °C.

Tanto a resolução (figura 38b) como o fator de retenção (figura 38d) mantiveram-se em valores não muito variantes com a passagem constante da fase móvel, reduzindo-se apenas com a mudança da temperatura.

As figuras 39 e 40 mostram os cromatogramas das separações a 250 e 10.000 volumes de fase móvel, respectivamente, ou seja, na temperatura de 40 °C. Os cromatogramas mostram boa separação dos picos mesmo após a passagem de 10.000 vezes o volume da fase móvel (cerca de 10 litros). A figura 41 apresenta o cromatograma da separação após a passagem de mais 5.000 volumes de fase móvel a uma temperatura de 60 °C, totalizando os 15.000 volumes de fase móvel.

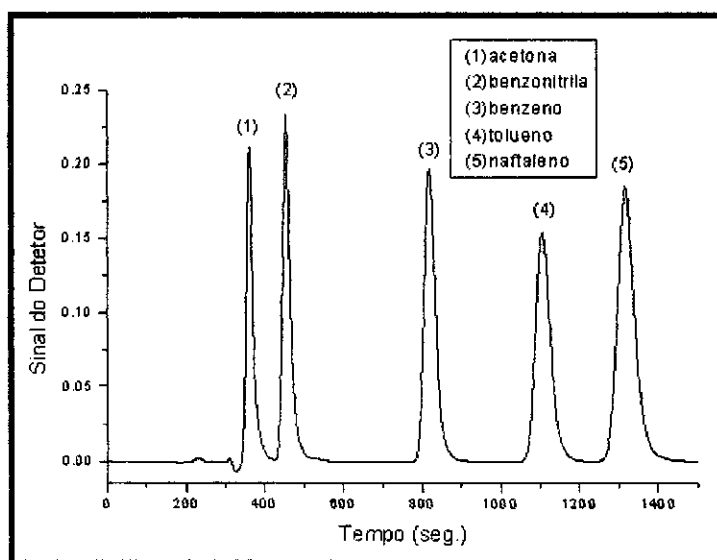


Figura 39 - Cromatograma da separação obtida com a coluna C18-2 após 250 V_M EtOH:H₂O 60:40 (v/v); F=0,2 mL min⁻¹ - 40 °C.

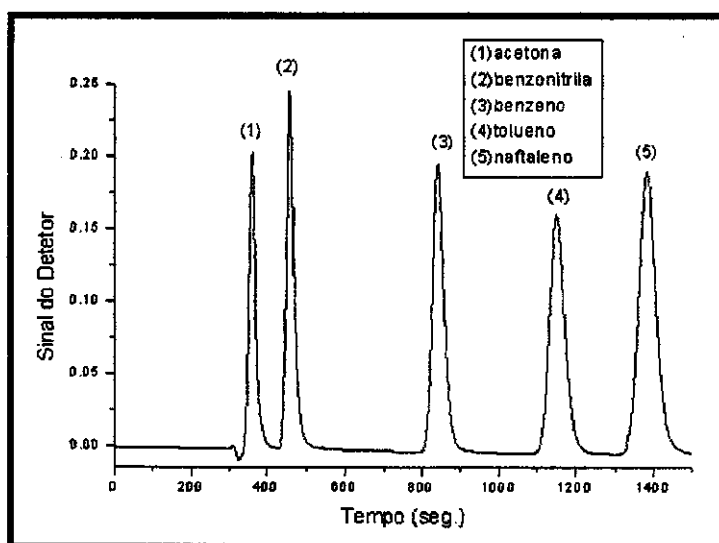


Figura 40 - Cromatograma da separação obtida com a coluna C18-2 após 10.000 V_M EtOH:H₂O 60:40 (v/v); $F=0,2 \text{ mL min}^{-1}$ - 40 °C.

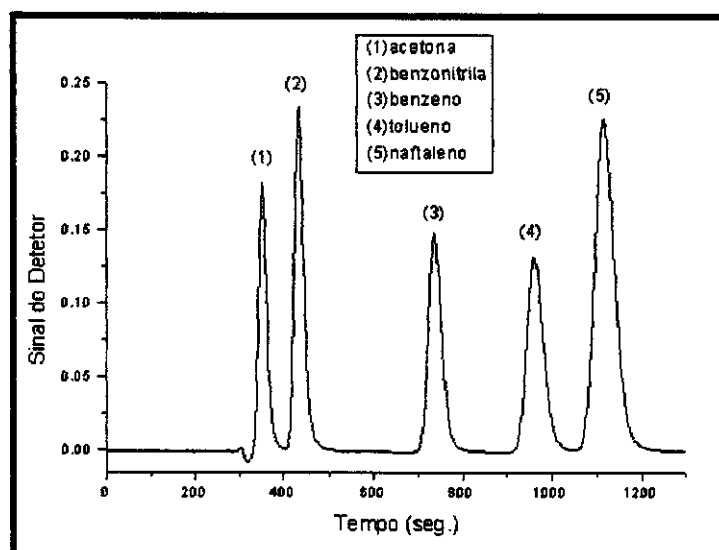


Figura 41 - Cromatograma da separação obtida com a coluna C18-2 após 5.000 V_M EtOH:H₂O 60:40 (v/v); $F=0,2 \text{ mL min}^{-1}$ - 60 °C.

Observando-se a queda de eficiência após a passagem de mais 5.000 volumes de fase móvel a 60 °C, foi realizada novamente mais uma corrida a 40 °C como forma de verificar se o efeito foi da temperatura de separação ou perda de polímero da fase estacionária. A figura 42 mostra o cromatograma da separação após a passagem dos 15.000 volumes de fase móvel. A eficiência da separação voltou ao nível de 30.000 pratos/metro, como obtido até os 10.000 volumes de fase móvel a 40 °C.

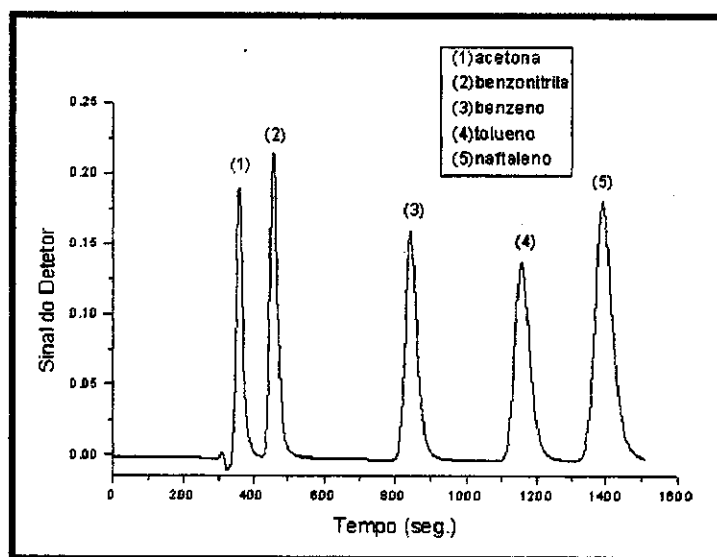


Figura 42 - Cromatograma da separação obtida com a coluna C18-2 após 15.000 V_M EtOH:H₂O 60:40 (v/v); $F=0,2 \text{ mL min}^{-1}$ - 40 °C.

Os resultados do teste de estabilidade realizado com a coluna C8 estão sumarizados na figura 43. Para a coluna do tipo C8 a eficiência (figura 43a) praticamente não variou até os 15.000 volumes de fase móvel, mantendo-se em torno de 34.000 pratos/metro, mesmo após a mudança da temperatura para 60 °C. O fator de assimetria (figura 43c) também manteve-se constante, em torno de 1,3, tanto a 40 como a 60 °C.

Os valores de resolução (figura 43b) e fator de retenção (figura 43d) decaíram somente com a mudança da temperatura, mantendo-se praticamente constante com a passagem contínua da fase móvel.

As figuras 44 e 45 apresentam os cromatogramas das separações após 250 e 10.000 volumes de fase móvel, respectivamente, na temperatura de 40 °C. A figura 46 mostra o cromatograma da separação realizada após a passagem de mais 5.000 volumes de fase móvel a 60 °C. Os cromatogramas não apresentam nenhuma mudança significativa nas separações dos picos após a passagem dos 15.000 volumes de fase móvel.

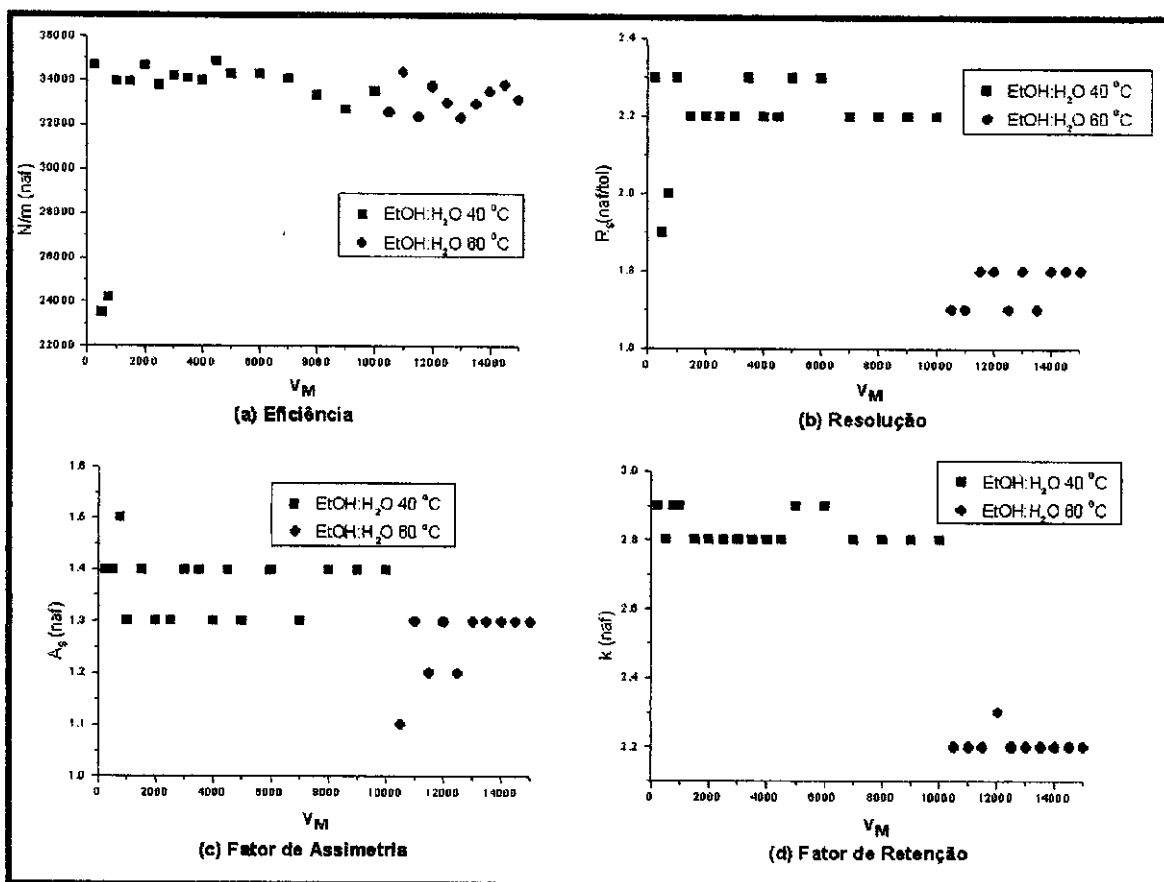


Figura 43 - Resultados do teste de estabilidade usando EtOH:H₂O como fase móvel - coluna C8-4.

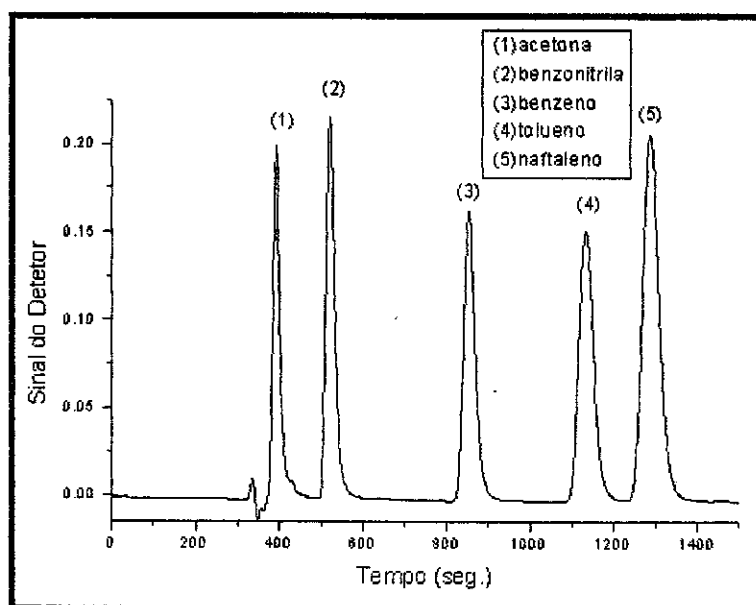


Figura 44 - Cromatograma da separação obtida com a coluna C8-4 após 250 V_M EtOH:H₂O 55:45 (v/v); $F=0,2 \text{ mL min}^{-1}$ - 40 °C.

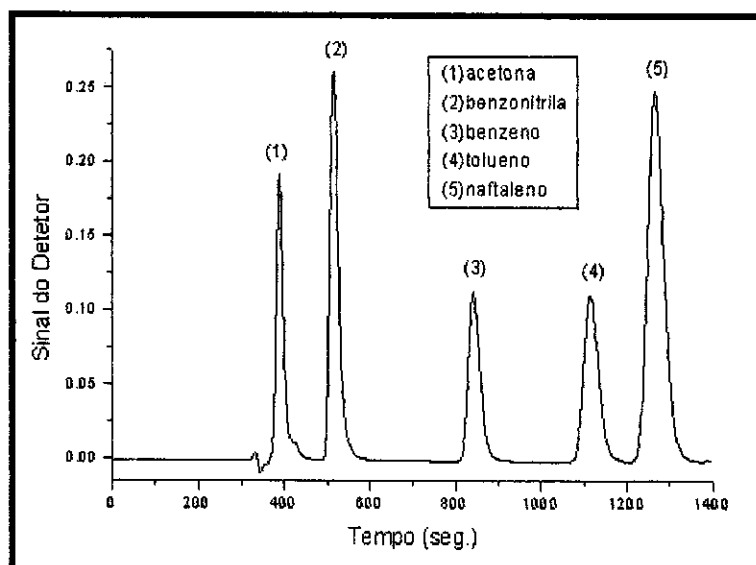


Figura 45 - Cromatograma da separação obtida com a coluna C8-4 após 10.000 V_M EtOH:H₂O 55:45 (v/v); $F=0,2 \text{ mL min}^{-1}$ - 40 °C.

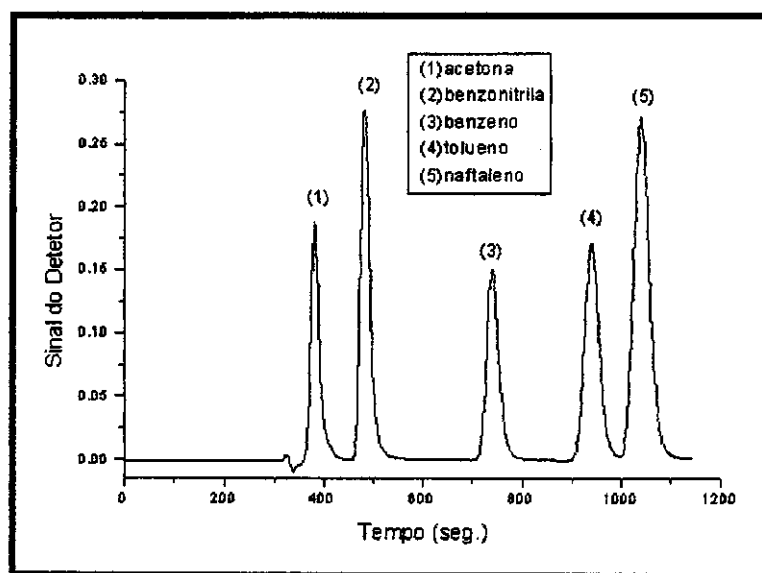


Figura 46 - Cromatograma da separação obtida com a coluna C8-4 após 5.000 V_M EtOH:H₂O 55:45 (v/v); $F=0,2 \text{ mL min}^{-1}$ - 60 °C.

4.7 - Separação da mistura básica:

Com relação à separação dos compostos básicos, anilina e N,N-dimetilanilina, os resultados são apresentados na tabela 28, utilizando a coluna de fase C18, e tabela 29, utilizando a coluna de fase C8. Para este procedimento foram utilizadas as colunas C18-1 e C8-3 (tabela 9). As figuras 47 e 48 mostram os cromatogramas obtidos na separação da mistura básica usando os diversos modificadores orgânicos, EtOH, MeOH e ACN.

Tabela 28 - Parâmetros cromatográficos obtidos com a separação da mistura básica - coluna C18-1.

SOLVENTE	N/m ^a	N/m ^b	R _s ^{ab}	A _s ^a	A _s ^b	k ^a	k ^b	t _R (min.) ^a	t _R (min.) ^b
EtOH 25 °C	16.400	25.100	7,8	1,6	1,7	0,2	0,8	6,6	11,6
EtOH 40 °C	15.700	23.500	7,0	1,5	1,6	0,2	0,8	6,4	10,9
MeOH 25 °C	6.800	18.300	4,8	0,9	1,7	0,2	1,0	6,6	10,6
ACN 25 °C	14.800	21.300	5,5	1,3	1,3	0,2	0,8	6,5	10,0

a = anilina; b = N,N-dimetilanilina

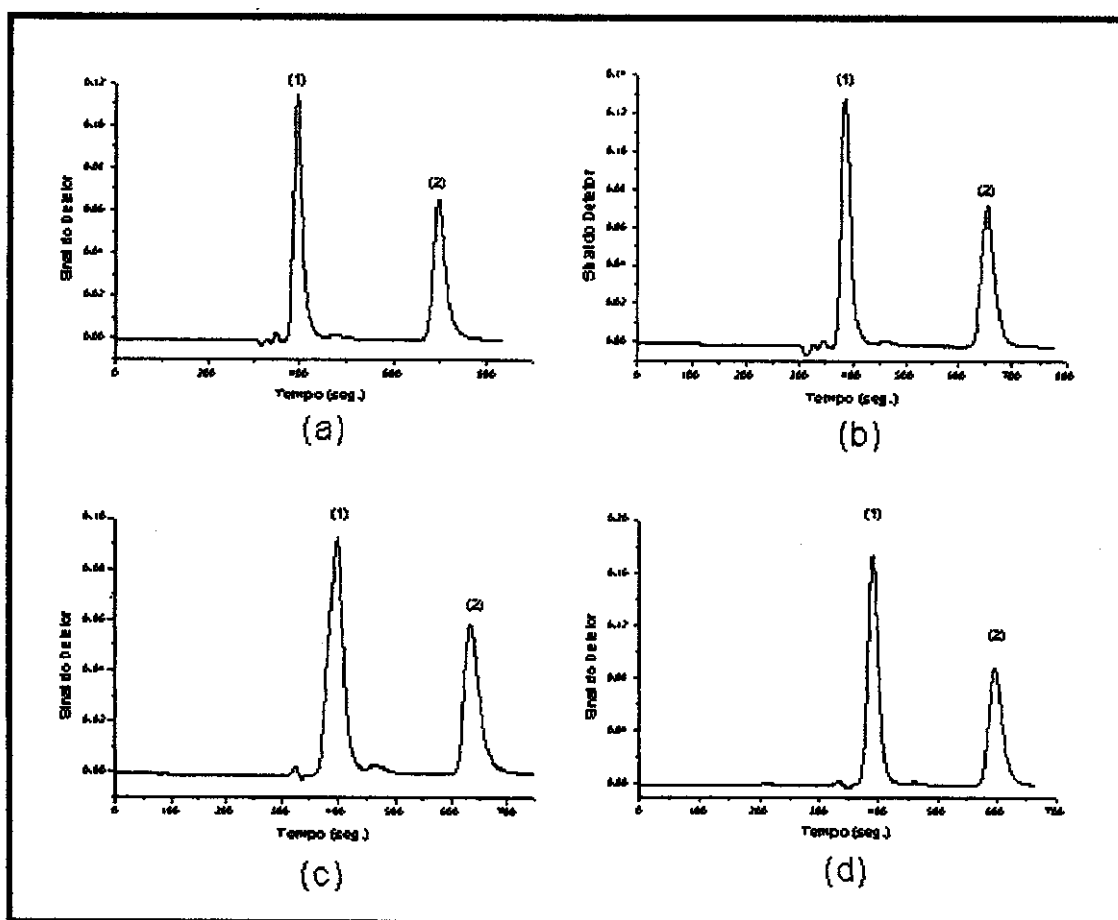


Figura 47 - Cromatogramas obtidos com a coluna C18-1 para a separação da mistura básica utilizando EtOH a 25 °C (a), EtOH a 40 °C (b), MeOH (c) e ACN (d) como modificadores orgânicos e fase estacionária C18. (1) anilina; (2) N,N-dimetilanilina.

Tabela 29 - Parâmetros cromatográficos obtidos com a separação da mistura básica - coluna C8-3.

SOLVENTE	N/m ^a	N/m ^b	R _s ^{ab}	A _s ^a	A _s ^b	k ^a	k ^b	t _R (min.) ^a	t _R (min.) ^b
EtOH 25 °C	16.300	27.200	5,6	1,6	1,5	0,3	0,9	7,0	10,2
EtOH 40 °C	18.800	26.200	4,9	1,5	1,7	0,2	0,7	6,8	9,5
MeOH 25 °C	7.900	23.500	3,4	1,0	1,6	0,2	0,6	7,0	9,5
ACN 25 °C	18.100	25.300	4,5	1,5	1,3	0,3	0,8	6,9	9,5

a = anilina; b = N,N-dimetilanilina

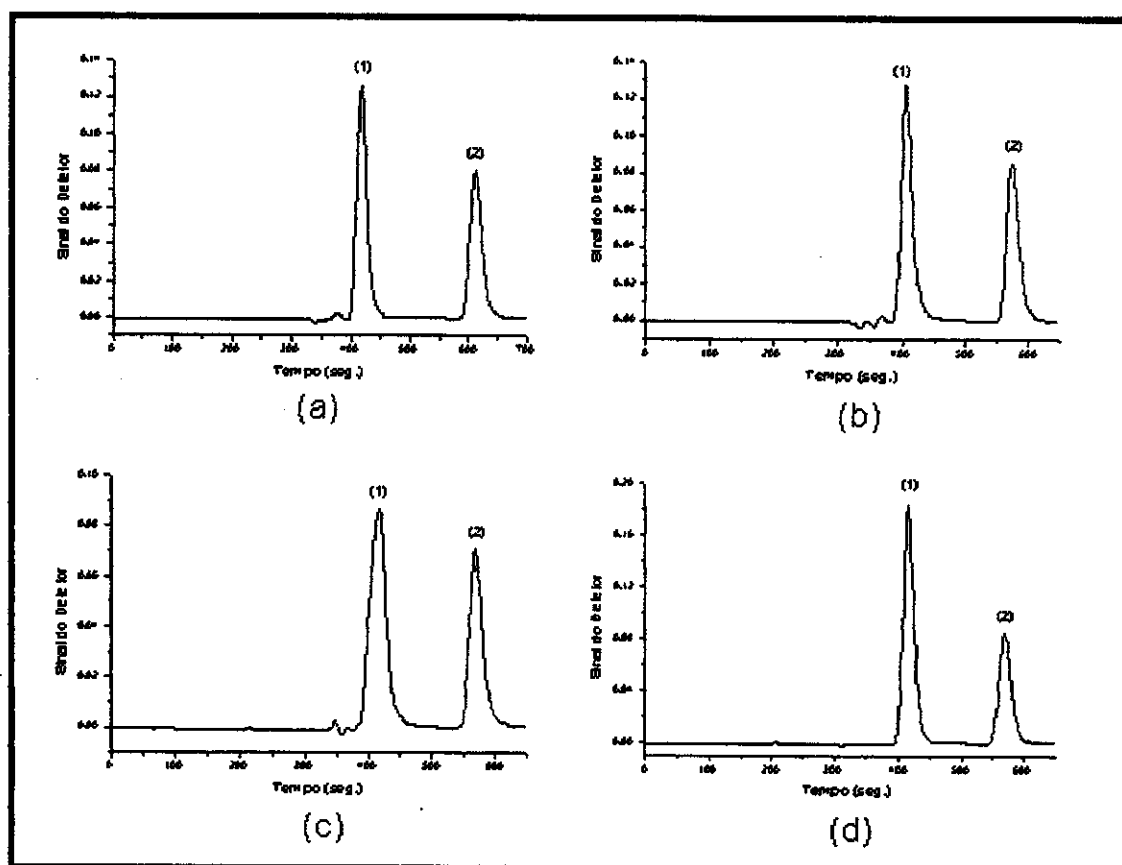


Figura 48 - Cromatogramas obtidos com a coluna C8-3 para a separação da mistura básica utilizando EtOH a 25 °C (a), EtOH a 40 °C (b), MeOH (c) e ACN (d) como modificadores orgânicos e fase estacionária C8. (1) anilina; (2) N,N-dimetilanilina.

Utilizando etanol como modificador orgânico, a eficiência da separação foi relativamente maior com relação às separações utilizando MeOH e ACN, tanto para a coluna C18 como para C8. Da mesma forma como para os compostos neutros, a eficiência, em geral, diminuiu com o aumento da temperatura para a separação dos compostos básicos, no entanto a assimetria dos picos foi reduzida para valores mais próximos do ideal.

Para todas as fases móveis, tanto o fator de retenção como o tempo de retenção dos compostos tiveram valores muito semelhantes, especialmente para etanol:água a 40 °C comparada às demais fases móveis contendo ACN e MeOH, tanto com a coluna C18 (tabela 28) como com a coluna C8 (tabela 29).

5 - CONCLUSÕES:

O etanol analisado, de dois lotes de fabricação, apresentou baixa absorvância em grande parte da região UV-VIS, como mostra os espectros (figura 14), indicando ser bastante útil para este tipo de detector, além do que a produção do solvente aparentou ser pouco diferente dentro dos lotes analisados.

Uma das dificuldades no uso de etanol é a alta viscosidade quando misturado com água, como confirmado na figura 16. Fases móveis muito viscosas podem reduzir a vida útil das fases estacionárias devido a uma maior pressão na entrada da coluna (*back pressure*). Assim, o uso de um forno para a coluna torna-se importante para que se trabalhe em temperaturas maiores de forma a reduzir a viscosidade da fase móvel. Deve-se considerar ainda que temperaturas elevadas (superiores a 80 °C) também podem comprometer a fase estacionária [10].

A partir dos resultados obtidos com o planejamento fatorial, pôde-se verificar a importante influência da temperatura como meio de otimização das separações com os ajustes dos parâmetros cromatográficos.

Otimizada a vazão através da curva de van Deemter, obtendo-se a eficiência máxima de cada coluna, comparou-se os resultados para as três fases móveis: etanol:água, metanol:água e acetonitrila:água com a mesma força de eluição. Como a vazão ótima - que influencia diretamente sobre o tempo total de separação da mistura - variou para cada fase móvel, os resultados, de uma maneira geral, podem ser avaliados como satisfatórios ou não, dentro do que se é recomendado pela literatura. Além disso, os resultados mostraram uma grande aplicabilidade do uso de etanol:água como fase móvel em baixas vazões, onde a eficiência (N/m) obtida foi similar, e em alguns casos superior, quando comparada às demais fases móveis (metanol:água e acetonitrila:água).

O efeito mais significativo da temperatura pôde ser observada no tempo de análise, tanto para a coluna de fase C18 como a de fase C8, para todas as fases móveis. Isso se deve, principalmente, à cinética mais rápida na transferência de massa do soluto entre as duas fases, móvel e estacionária. Esse efeito acaba influenciando também na resolução dos picos, diminuindo-a, tornando necessário a avaliação da temperatura de separação para que a resolução mínima até a linha de base seja obtida. A diminuição da assimetria foi mais significativa com a coluna de fase C18 do que a de fase C8. Vários fatores podem estar associados a isso, como a interação maior ou menor do soluto, naftaleno, devido a polaridade da fase estacionária e da fase móvel. Avaliando-se estes parâmetros cromatográficos, o uso de etanol:água mostrou-se bastante interessante, já que os parâmetros cromatográficos utilizados para avaliação da separação encontraram-se dentro dos recomendados pela literatura [4] dentro da faixa de temperatura estudada.

Com relação à estabilidade das fases estacionárias, o uso de etanol:água em maiores vazões (cerca de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$) não apresentou influências significativas com sua contínua passagem até 15.000 volumes de fase móvel pela coluna cromatográfica. Assim, os resultados mostram a perfeita utilização de etanol como modificador orgânico da fase móvel, já que as colunas cromatográficas utilizadas, C18 e C8, apresentaram boa estabilidade frente ao uso deste solvente - de viscosidade maior à dos demais solventes, metanol e acetonitrila.

Na separação de compostos básicos, o uso de etanol como modificador orgânico, comparado aos outros modificadores, ofereceu boa separação entre os picos. Em se tratando de compostos básicos, que sofrem fortes interações com os grupos silanóis residuais da fase estacionária, as assimetrias dos picos foram satisfatórias com o uso de etanol:água, variando de 1,5 a 1,7, similares às obtidas com as demais fases móveis.

Comparativamente aos outros solventes orgânicos também usados em CLAE-fase reversa, tais como metanol e acetonitrila, etanol possui menor efeito tóxico. Isso se torna uma grande vantagem para seu uso rotineiro em laboratório, além do que as suas propriedades cromatográficas mostraram-se bastante interessantes, tanto para a separação de compostos neutros como compostos de caráter básico.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1 - SADEK, P. C. *The HPLC solvent guide*. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1996.
- 2 - SEAYER, C. & SADEK, P. *Solvent selection, Part I - UV absorption characteristics*. LC-GC, 12 (1994) 742-746.
- 3 - SEAYER, C & PRZYYTEK, J. *Solvent selection, Part II - Physical properties*. LC-GC, 13 (1995) 220-227.
- 4 - SNYDER, L. R. & KIRKLAND, J. J. *Introduction to modern liquid chromatography. 2nd Edition*. John Wiley & Sons. New York, 1979.
- 5 - COLLINS, C. H., BRAGA, G.L. & BONATO, P. S. *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 4^a Edição. Editora da Unicamp. Campinas, 1990.
- 6 - BREATHERICK, I. *Hazards in the chemical laboratory*. 4th Edition. Royal Society of Chemistry. London, 1986.
- 7 - BRAITHWAITE, A. & SMITH, F.J. *Chromatographic methods*. 5th Edition. Blackie Academic & Professional. London, 1996.
- 8 - BROWN, P. R. & HARTWICK, R. A. *High Performance Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons. New York, 1989.
- 9 - SNYDER, L. R., GLAJCH, J. L. & KIRKLAND, J. J. *Practical HPLC method development*. John Wiley & Sons. New York, 1988.

- 10- MEYER, V. R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons. New York, 1993.
- 11- SNYDER, L. R. *Classification of the solvent properties of common liquids*. Journal of Chromatography, 92 (1974) 223-230.
- 12- SNYDER, L. R. *Classification of the solvent properties of common liquids*. Journal of Chromatographic Science, 16 (1978) 223-234.
- 13- CLAESSENS, H. A., VERMEER, E. A. and CRAMERS, C. A. *A Comparison of Reversed-Phase Performance for Some Commercially Available C18 Columns*. LC-GC, 12 (1994) 114-121.
- 14- *Guidelines for Formulating Mobile Phases for Various Reversed Phase HPLC Columns*. Supelco, bulletin 788G, 1995.
- 15- KIRKLAND, J. J. *The use of porous Silica-Based Column Packings in HPLC Method Development*. LC-GC, (1997) 346-355.
- 16- SNYDER, L. R., DOLAN, J. W., MOLNAR, I. and DJORDJEVIC, N. M. *Selectivity Control in Reversed-Phase HPLC Method Development - Varying Temperature and Solvent Strength to Optimize Separations*. LC-GC, 15 (1997) 136-151.
- 17- ZHU, P. L., SNYDER, L. R., DOLAN, J. W., DJORDJEVIC, N. M., SANDER, L. C. and WAEGHE, T. J. *Combined use of temperature and solvent strength in reversed-phase gradient elution. I. Predicting separation as a function of temperature and gradient conditions*. Journal of Chromatography A, 756 (1996) 21-39.

- 18- ZHU, P. L., DOLAN, J. W., SNYDER, L. R. *Combined use of temperature and solvent strength in reversed-phase gradient elution. II. Comparing selectivity for different samples and systems.* Journal of Chromatography A, 756 (1996) 41-51.
- 19- LUKULAY, P. H. and MCGUFFIN, V. L. *Parametric Modulation in Liquid Chromatography: Multivariate Optimization of Mobile Phase Composition and Temperature.* Analytical Chemistry, 69 (1967) 2963-2971.
- 20- POPPE, H. and KRAAK, J. C. *Influence of thermal conditions on the efficiency of high performance liquid chromatographic columns.* Journal of Chromatography, 282 (1983) 399-412.
- 21- NETO, B. B., SCARMÍNIO, I. S. & BRUNS, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos.* 2ª Edição. Editora da Unicamp. Campinas, 1996.
- 22- BOX, G. E. P. and DRAPER, N. R. *Empirical Model-Building and Response Surfaces.* John Wiley & Sons. New York, 1987.
- 23- BOX, G. E. P., HUNTER, W. G. e HUNTER, J. S. *Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building.* John Wiley and Sons 1978.
- 24- ANAZAWA, T. A. *Preparação, caracterização e avaliação de diferentes fases estacionárias reversas, tipo C8, para CLAE.* Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, Unicamp. 1996.